

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG VON POLYCYSTIN-2 IN HINBLICK AUF EINE
POTENTIELLE BETEILIGUNG AN DER REGULATION DES
TUBULUSDURCHMESSERS ANHAND VON KNOCK-IN-MÄUSEN UND Ca^{2+} -
IMAGING

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Philipp Schober

2018

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG VON POLYCYSTIN-2 IN HINBLICK AUF EINE
POTENTIELLE BETEILIGUNG AN DER REGULATION DES
TUBULUSDURCHMESSERS ANHAND VON KNOCK-IN-MÄUSEN UND Ca^{2+} -
IMAGING

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Philipp Schober

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Witzgall
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	11.03.2019

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)	4
1.1.1. Definition	4
1.1.2. Genetische Grundlagen	4
1.1.3. Epidemiologie	4
1.1.4. Klinik	4
1.1.5. Entstehung von Nierenzysten	6
1.1.6. Genprodukte von <i>PKD1</i> und <i>PKD2</i>	6
1.2. Eigenschaften von Polycystin-2	7
1.3. Physiologische und Pathophysiologische Rolle von PC-2 (und PC-1)	8
1.4. Bisherige Mausmodelle	10
1.5. Vorarbeit des Instituts und Zielsetzung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.1.1. Chemikalien	13
2.1.2. Puffer und Lösungen	14
2.1.3. Enzyme	18
2.1.3.1. Restriktionsenzyme	18
2.1.3.2. DNA/RNA-modifizierende Enzyme	18
2.1.4. Nukleotide	19
2.1.4.1. Primer	19
2.1.4.2. Plasmide	19
2.1.5. Antikörper und Phalloidin	20
2.1.6. Kits	21
2.1.7. Mauslinien	21
2.1.8. Bakterienstämme und Zelllinien	21
2.1.9. Kulturmedien	22
2.1.10. Geräte	23
2.1.11. Verbrauchsmaterialien und Glaswaren	25
2.1.12. Software	26
2.2. Methoden	27
2.2.1. Mauszucht und Genotypisierung	27
2.2.2. Gewebeentnahme aus Mäusen	27
2.2.3. DNA-Isolierung	27
2.2.4. RNA-Isolierung	28
2.2.5. Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	28
2.2.6. cDNA-Synthese	28
2.2.7. PCR	29
2.2.7.1. Konventionelle PCR	29
2.2.7.2. qPCR	30
2.2.8. Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.9. mRNA-Nachweis mittels Restriktionsenzymverdau	31
2.2.10. Proteinisolierung	32
2.2.10.1. Proteinisolierung aus LLC-PK ₁ -Zellen	32
2.2.10.2. Proteinisolierung aus Mäusenieren	33
2.2.10.3. Bradford-Assay	33
2.2.11. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western Blot	34
2.2.11.1. Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.2.11.1.1. Gießen eines 8%-igen Gels	34
2.2.11.1.2. Gießen eines Gradienten-Gels (8%-14%)	35

2.2.11.1.3.	Elektrophorese.....	37
2.2.11.2.	Western Blot	37
2.2.11.2.1.	Semidry Western Blot	37
2.2.11.2.2.	Wet bzw. Tank-Blot	38
2.2.11.2.3.	Entwickeln des Western Blots	38
2.2.11.2.4.	Quantifizierung des Western Blots	39
2.2.12.	Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und HE-Färbung	39
2.2.12.1.	Fertigung von Kryo- und Paraffinschnitten	39
2.2.12.2.	HE-Färbung an Paraffinschnitten	39
2.2.12.3.	DAB-Färbung an Paraffinschnitten	40
2.2.12.4.	Herstellung der DAB-Lösung	42
2.2.12.5.	Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten	42
2.2.12.6.	Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten.....	43
2.2.12.7.	Immunfluoreszenz an Zellen auf Deckgläschen	43
2.2.12.8.	Bildaufnahme	44
2.2.13.	Klonierung	44
2.2.13.1.	Klonierungsstrategie	44
2.2.13.2.	Restriktionsenzymverdau.....	45
2.2.13.3.	Gelextraktion.....	46
2.2.13.4.	Ligation	47
2.2.13.5.	Transformation von elektrokompenten Zellen.....	47
2.2.13.6.	Mini-Plasmidpräparation	48
2.2.13.7.	Testverdau.....	49
2.2.13.8.	Midi-Plasmidpräparation	50
2.2.13.9.	Sequenzierung.....	50
2.2.13.10.	Transformation von chemisch kompetenten Zellen.....	51
2.2.14.	Zellkultur und Transfektion.....	52
2.2.14.1.	Zellkultur.....	52
2.2.14.2.	Passagieren von (adhärenten) Zellen	52
2.2.14.3.	Aussaat von Zellen zur transienten Transfektion.....	52
2.2.14.4.	Transiente Transfektion	53
2.2.15.	GCaMP-Messungen.....	54
2.2.15.1.	Vorbereitung	54
2.2.15.2.	Messung	54
2.2.15.3.	Auswertung	55
2.2.16.	Bestimmung der Lumengröße von Tubuli.....	56
2.2.17.	Mathematische und statistische Methoden	57
3.	Ergebnisse	58
3.1.	Genotypisierung	58
3.2.	mRNA-Nachweis	59
3.3.	Protein-Nachweis	62
3.4.	Phänotyp der Knock-In-Mäuse	64
3.4.1.	Allgemeines	64
3.4.2.	Bestimmung des Zystenursprungs.....	66
3.4.3.	Bestimmung des Tubulusdurchmessers.....	70
3.5.	Untersuchung der Ca ²⁺ -Leitfähigkeit mittels GCaMP-Messungen	80
3.5.1.	Prinzip.....	80
3.5.2.	Ergebnis der Klonierung der GCaMP-Konstrukte	81
3.5.3.	Resultate der GCaMP-Messungen.....	83
4.	Diskussion	90
4.1.	Interpretation der Ergebnisse	90

4.1.1.	mRNA- und Proteinnachweis	90
4.1.2.	Ca ²⁺ -Imaging	91
4.1.3.	Phänotyp der Mäuse	93
4.1.3.1.	Grundlagen des Phänotyps.....	93
4.1.3.2.	Interpretation des Phänotyps und Vergleich zu anderen Mauslinien....	94
4.2.	Überlegungen zum potentiellen Regelkreis	97
4.2.1.	Ca ²⁺ als zentraler Baustein bei ADPKD (und eines potentiellen Regelkreises)	97
4.2.2.	Überlegungen zum potentiellen Mechanismus des Regelkreises	99
5.	Zusammenfassung	105
6.	Anhang	107
6.1.	HE-Färbung von Nieren homozygoter Knock-In-Mäuse auf 129/Sv-Hintergrund ..	107
6.2.	DAB-Färbung von Nieren homozygoter Knock-In-Mäuse auf 129/Sv-Hintergrund	108
6.2.1.	3 Monate altes Tier	108
6.2.2.	6 Monate altes Tier	109
6.2.3.	9 Monate altes Tier	110
6.2.4.	12 Monate altes Tier	111
6.3.	Statistische Auswertung der Bestimmung der Tubulusquerschnittsfläche	112
6.3.1.	Auswertung der Sammelrohre mit 129/Sv-Hintergrund	112
6.3.2.	Auswertung der distalen Tubuli, Pars Recta, mit 129/Sv-Hintergrund	114
6.3.3.	Auswertung der Sammelrohre mit C57Bl/6-Hintergrund.....	116
6.4.	Plasmidkarten.....	118
7.	Literaturverzeichnis.....	124
8.	Danksagung	134
9.	Lebenslauf	135

1. Einleitung

1.1 Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

1.1.1. Definition

Unter der autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) versteht man eine Erkrankung, welche sich vor allem durch die Ausbildung von renalen, bilateralen, flüssigkeitsgefüllten Zysten mit nachfolgender progressiver Vergrößerung der Nieren manifestiert.^(1, 2, 3, 4)

1.1.2. Genetische Grundlagen

Die genetische Grundlage für die ADPKD sind inaktivierende Mutationen^(5, 6) in den Genen *PKD1* (polycystic kidney disease 1) und *PKD2*, wobei zu 85% das *PKD1*-Gen und zu 15% das *PKD2*-Gen betroffen ist^(7, 8). Beide Gene kodieren jeweils für ein integrales Membranprotein, genannt Polycystin-1 (PC-1) bzw. Polycystin-2 (PC-2)^(9, 10, 11, 12, 13).

Der Erbgang der Erkrankung ist autosomal-dominant, wobei 5% der Erkrankungen auf Spontanmutationen zurückzuführen sind.⁽¹⁾

1.1.3. Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von ca. 30-50:100.000⁽¹⁴⁾ (laut älteren Daten bis zu 100:100.000^(15, 16)) gehört die ADPKD zu den häufigsten Erbkrankheiten und ist der häufigste monogenetische Grund für das Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz^(5, 14, 17, 18, 19). In den USA sind ca. 5 % aller neu aufgetretenen terminalen Niereninsuffizienzen auf die ADPKD zurückzuführen⁽¹⁾ und in Europa beträgt die Prävalenz dieser Erkrankung bei Patienten, die ein Nierentransplantat erhalten, ca. 10 %⁽²⁰⁾.

Mit 60 Jahren leiden 50% der ADPKD-Patienten an einer terminalen Niereninsuffizienz^(21, 22).

1.1.4. Klinik

Hauptmerkmal der ADPKD ist eine progrediente Zunahme des totalen Nierenvolumens. Während dieses in der Normalbevölkerung ca. 200 ml beträgt⁽²³⁾, erreichen ADPKD-Patienten, hauptsächlich bedingt durch die Zunahme des totalen Zystenvolumens, ein totales Nierenvolumen von teilweise mehreren Litern, bei einem Nieren-Gesamtgewicht von teilweise bis zu 22 kg.^(4, 24)

Durch die Ausbildung und das Wachstum der renalen Zysten kommt es zu einer Obstruktion von nicht betroffenen Nephronen, zu interstitiellen Entzündungs- und Fibrosereaktionen,

sowie zur Atrophie der Tubulusepithelzellen^(2, 21, 25, 26). Darüber hinaus kommt es auch zu einer Sklerose der kleinen Nierenarterien und -arteriolen⁽²⁾. Diese führt zu einem Untergang des funktionstüchtigen Nierenparenchyms und der normalen Nierenarchitektur und somit zu einem Funktionsverlust der Niere durch Störungen der glomerulären Filtration, der Harnkonzentrierung und des renalen Blutflusses^(2, 4, 21, 27). Relativ früh wird dabei die Konzentrationsfähigkeit und Ammoniakausscheidung beeinträchtigt⁽²⁾, die glomeruläre Filtrationsrate bleibt durch kompensatorische Steigerung der Filtrationsfraktion relativ lange konstant, allerdings auf Kosten einer gesteigerten Albuminexkretion⁽²⁷⁾. Im späteren Verlauf nimmt die glomeruläre Filtrationsrate aber dennoch bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz ab^(4, 17, 18, 21).

In den ersten Lebensjahren verläuft die ADPKD in der Regel symptomfrei, Beschwerden treten häufig erst ab dem 30. Lebensjahr auf, ein frühes Auftreten von Symptomen ist dabei mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet⁽²²⁾. Die häufigste Erstmanifestation ist die arterielle Hypertonie, welche in der Regel schon vor einem relevanten Abfall der glomerulären Filtrationsrate auftritt^(2, 28, 29). Weitere Frühsymptome sind abdominelle Schmerzen und Makrohämaturie^(28, 29, 30).

Im Verlauf der Erkrankung haben Patienten vermehrt Harnwegsinfekte und Infektionen der renalen Zysten^(2, 31, 32, 33). Weitere renale Komplikationen sind Nierensteine, welche häufiger als in der Normalbevölkerung auftreten, und Zystenrupturen^(1, 2, 34).

Neben den renalen Manifestationen ist die ADPKD auch mit einer Reihe von extrarenalen Symptomen vergesellschaftet.

So kommt es abgesehen von renalen Zysten auch zur Zystenbildung in anderen Organen, beispielsweise in der Glandula vesiculosa (was selten zu Infertilität führt), im Pankreas oder in den Ovarien^(1, 2, 28, 35, 36). Die häufigste extrarenale Zysten-Lokalisation ist aber die Leber (bei ca. 80% der Patienten sind hier Zysten zu finden), deren Befall jedoch häufig asymptomatisch verläuft und in der Regel nicht zum Leberversagen führt^(2, 28, 35, 37). Seltener kommt es durch die Raumforderungen bei großen Leberzysten trotzdem zu Symptomen wie Dyspnoe, Schmerz, Appetitlosigkeit oder gastroösophagealer Reflux^(2, 28). Darüber hinaus kann es zur Kompression von Vena cava inferior, Lebervenen oder Gallengängen kommen oder auch zu Einblutungen oder Infektionen der Leberzysten^(1, 2).

Des Weiteren haben ADPKD-Patienten ein erhöhtes Risiko für intrakranielle Aneurysmata^(28, 35, 36, 38), was zu Komplikationen wie Thrombembolien, Hirnnervenausfälle durch die Raumforderung und Subarachnoidalblutungen führen kann^(39, 40). Darüber hinaus kommt es durch die bei ADPKD bestehende Hypertonie gehäuft zur linksventrikulären Hypertrophie, was auch schon bei Kindern mit ADPKD der Fall sein kann^(2, 28, 41). Weitere kardiovaskuläre Manifestationen sind endotheliale Dysfunktionen, erhöhte Intima-Media-Dicke der Gefäße, Mitralklappenprolaps und Aortenklappeninsuffizienz, bedingt durch eine Dilatation der Aortenwurzel^(2, 28, 35).

Die durchschnittliche Lebenserwartung von ADPKD-Patienten beträgt 60 Jahre, Haupttodesursachen sind dabei kardiale Ereignisse (Herzinfarkt und dekompensierte Herzinsuffizienz), bedingt durch Hypertonus und Atherosklerose, und Infektionen (v.a. Sepsis nach Harnwegsinfekt oder infizierter Nierenzyste). Bedingt durch das Vorhandensein geeigneter Nierenersatzverfahren versterben nur die wenigsten Patienten an den direkten Folgen einer Niereninsuffizienz.⁽²⁵⁾

1.1.5. Entstehung von Nierenzysten

Trotz des autosomal-dominanten Erbgangs liegt bei der Entstehung der Nierenzysten auf zellulärer Ebene eigentlich ein rezessiver Mechanismus vor⁽⁴²⁾. Nachdem durch die Vererbung einer Mutation ein Allel inaktiv wurde, kommt es erst zur Zystenbildung, nachdem auch im zweiten Gen eine „Loss-of-function“-Mutation aufgetreten ist^(43, 44). Da dieser somatische „second-hit“ aber nicht in allen Zellen auftritt, ist nur ein kleiner Teil des Tubulussystems betroffen (in der Regel ca. 1000 von 1.000.000 Nephronen)⁽⁵⁾. Es wird auch diskutiert, ob neben dem somatischen „second hit“ auch noch ein „third hit“ in Form von nierenschädigenden Faktoren nötig ist, um die Entstehung der Zysten zu induzieren oder zu beschleunigen^(5, 45, 46).

1.1.6. Genprodukte von *PKD1* und *PKD2*

PC-1, das integrale Membranprotein, welches durch *PKD1* kodiert wird, besitzt elf Transmembrandomänen, wobei sich der C-Terminus intra-, und der N-Terminus

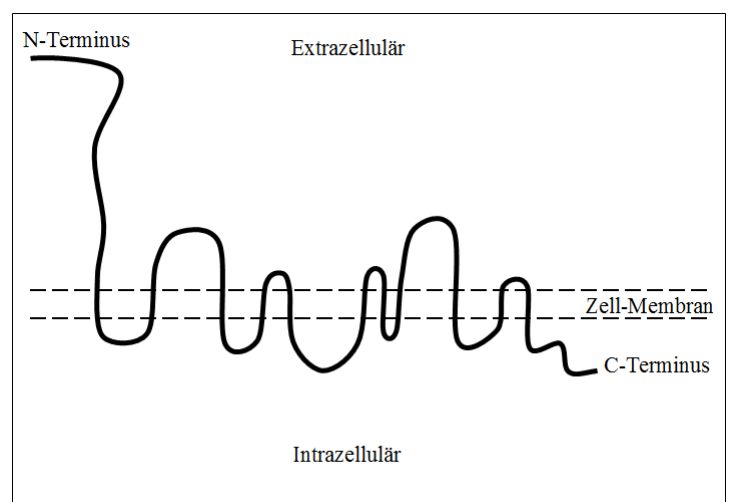


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von Polycystin-1 (N-Terminus verkürzt dargestellt)⁽¹⁰⁾

extrazellulär befindet⁽⁴⁷⁾. Der extrazelluläre N-Terminus von PC-1 macht den deutlich größeren Teil des Proteins aus⁽²⁷⁾ und es wird davon ausgegangen, dass er als Chemo- oder Mechanosensor dient^(48, 49, 50).

PC-2, welches durch *PKD2* kodiert wird^(12, 13), dient im Unterschied zu PC-1 nicht als Chemo- oder Mechanosensor, sondern formt als Multimer einen Kanal mit hoher Leitfähigkeit für Ca^{2+} ^(51, 52, 53, 54, 55). Weitere Eigenschaften von PC-2 werden im Folgenden beschrieben.

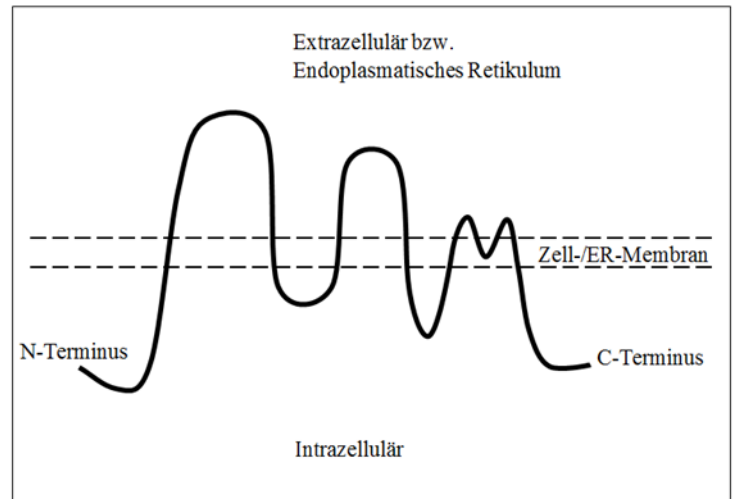


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von Polycystin-2 ⁽⁵⁶⁾

1.2. Eigenschaften von Polycystin-2

PC-2 besteht aus 968 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 110 kD^(12, 13). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei PC-2 um ein integrales Membranprotein^(12, 13), welches sechs Transmembrandomänen besitzt, wobei sowohl C-Terminus, als auch N-Terminus und die Loops 2 und 4 zytoplasmatisch sind, die Loops 1,3 und 5 ragen ins Lumen (vgl. auch Abbildung 1.2)^(12, 56).

Während ältere Ergebnisse nahelegen, dass Polycystin-2 als Homotetramer einen Ionenkanal formt, wobei die Interaktion zwischen den Proteinen sowohl am C- als auch am N-Terminus stattfindet^(5, 57), weisen neuere Ergebnisse darauf hin, dass der Kanal durch ein Homotrimer, bestehend aus drei Polycystin-2-Proteinen⁽⁵⁸⁾ bzw. durch ein Heterotetramer, bestehend aus drei Polycystin-2- und einem Polycystin-1-Molekül^(59, 60), gebildet wird und die Interaktion nur über die coiled-coil-Domäne am C-Terminus geschieht ^(58, 59, 60).

Der durch Polycystin-2 gebildete Ionenkanal ist permeabel für mono- und divalente Kationen und besitzt eine hohe Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen^(51, 52, 53, 54, 55). Es wird davon ausgegangen, dass die Region von PC-2, welche sich dabei an der Bildung der Kanalpore beteiligt, sich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne befindet, eventuell ist auch die dritte Transmembrandomäne involviert^(5, 42, 55).

Die Leitfähigkeit des Kanals wird u.a. moduliert durch ein EF-Hand-Motiv am C-Terminus, welches in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration zu einer Konformationsänderung des C-

Terminus führt, wodurch bei steigender Ca^{2+} -Konzentration die Leitfähigkeit zunächst zunimmt, bei sehr hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (über 1,26 mM) aber gehemmt wird^(51, 61, 62).

PC-2 interagiert des Weiteren sowohl mit dem C-Terminus als auch mit dem N-Terminus mit vielen andern Proteinen. Am N-Terminus wären da Kif3a, α -Aktinin⁽⁶³⁾ und Fibrocystin (über Kif3b) zu nennen^(64, 65). Am C-Terminus sind vor allem Polycystin-1 und Polycystin-2 selbst hervorzuheben, des Weiteren gibt es noch mehr als 20 andere Interaktionspartner^(66, 67).

Die intrazelluläre Verteilung von PC-2 ist noch nicht endgültig geklärt, der größte Teil von PC-2 ist vermutlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, bedingt durch ein ER-Retentionssignal, und fungiert dort als Ca^{2+} -freisetzender Kanal^(12, 13, 51, 54). Diskutiert wird aber auch, ob PC-2 eventuell die somatische Zellmembran erreicht^(68, 69, 70). Möglich wäre, dass durch die Interaktion von PC-1 mit PC-2 das ER-Retentionssignal maskiert wird und so ein Teil von PC-2 die somatische Zellmembran erreichen kann^(53, 68). Allgemein anerkannt ist aber die Tatsache, dass PC-2 über ein RVxP-Motiv zum primären Zilium transportiert wird^(71, 72, 73).

Der Transport ins primäre Zilium wird durch Rab8a reguliert⁽⁷⁴⁾. Dort co-lokalisiert PC-2 mit PC-1, welches unabhängig von PC-2 das primäre Zilium erreicht^(72, 73). Im primären Zilium bilden die beiden Proteine dann eine funktionelle Einheit, welche vermutlich als Mechano- oder Chemosensor für die Tubuluszellen fungiert, wobei PC-1 mit seinem langen extrazellulären Teil als Rezeptor dient und in Abhängigkeit vom eingegangenen Signal die Leitfähigkeit von PC-2 für Ca^{2+} moduliert^(48, 49, 50, 66, 67). Bedeutung hat dieser Mechano- oder Chemosensor vermutlich v.a. für die Zellen des distalen Tubulus, Pars recta und Pars convoluta, (mit Ausnahme der Macula densa), die Verbindungstubuluszellen und die Hauptzellen des Sammelrohres, da vor allem hier PC-2 exprimiert wird⁽⁷⁵⁾.

1.3. Physiologische und pathophysiologische Rolle von PC-2 (und PC-1)

Wie oben bereits angedeutet, erfüllt PC-2 vermutlich mehrere physiologische Aufgaben. Zum einen ist es an der Regulierung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum beteiligt, einerseits dadurch, dass der Großteil von PC-2 selbst im ER lokalisiert ist und dort einen Ca^{2+} -freisetzenden Kanal formt, wobei diese Aufgabe vermutlich durch Schwankungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reguliert wird^(51, 54, 61, 62). Andererseits beeinflusst PC-2 auch die Aktivität der beiden anderen wichtigsten Ca^{2+} -Kanäle im ER, nämlich die des Ryanodin-Rezeptors und des IP_3 -Rezeptors. Im Rahmen der ADPKD kommt es daher auch zur gestörten Ca^{2+} -Homöostase in den Zellen.

Zum anderen formt PC-2 im primären Zilium in Kooperation mit Polycystin-1 einen Mechano- oder Chemosensor, der einen Ca^{2+} -Strom von extrazellulär ins primäre Zilium reguliert. Wie schon beschrieben, hat hierbei PC-1 vermutlich die Aufgabe des Rezeptors, der die Aktivität von PC-2 moduliert, welches dann als Transduktor den Ca^{2+} -Strom verändert^(48, 49, 50, 59, 66, 67, 73). Wahrscheinlich wird durch diesen Ca^{2+} -Fluss die Expression verschiedener Gene gesteuert (unter Umständen durch den Zwischenschritt der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Kompartimenten)^(5, 50), die genaue Bedeutung für den Tubulus und die ADPKD ist aber noch unklar.

In einem Experiment von Ma et al.⁽⁷⁶⁾ wurde bei Mäusen Polycystin-1 bzw. -2 (bi-allelisch) inaktiviert. Daraufhin kam es, wie erwartet, zum starken Wachstum von Zysten. Anschließend wurde in diesen Mäusen die Funktionsfähigkeit des primären Ziliums blockiert, was das Zystenwachstum deutlich verlangsamte. Dieser Benefit auf die Zystenbildung war dabei zeitabhängig, je kürzer die Zeit zwischen dem Funktionsverlust von PC-1/-2 und dem primären Zilium, desto kleiner waren die Zysten.⁽⁷⁶⁾

Die Autoren folgerten daraus, dass durch den Polycystin-Komplex eine tonische Hemmung vermittelt wird, die eine im primären Zilium lokalisierte Signalkaskade hemmt, welche zum Wachstum des Tubulusdurchmessers führen würde. Sie gehen des Weiteren davon aus, dass es eine gewisse Ruheaktivität der Polycystine gibt, die dann flussabhängig moduliert wird.⁽⁷⁶⁾

Dies führt zur Hypothese, dass der Polycystin-Komplex Teil eines Regelkreises ist, der den Durchmesser des Tubulus reguliert: In Abhängigkeit vom Urinfluss wird Polycystin-1 in seiner Funktion als Mechano- oder Chemosensor mehr oder weniger aktiviert und moduliert dann seinerseits die Aktivität von Polycystin-2 in unterschiedlichem Ausmaß, was zu einem veränderten Ca^{2+} -Strom von extrazellulär nach intrazellulär führt. Durch diesen veränderten Ca^{2+} -Influx könnten Wachstumssignale reguliert werden, wodurch ein definierter Tubulusdurchmesser zustande käme.⁽⁷⁷⁾

Ob dieser Ca^{2+} -gesteuerte Regelkreis der Grund für das Zystenwachstum bei der ADPKD ist, ist unklar, da die Polycystine beispielsweise auch über direkte Protein-Protein-Interaktionen in diverse Signalwege involviert sind. So ist Polycystin-1 an den Signalwegen von G-Proteingekoppelten Rezeptoren^(78, 79) beteiligt und sowohl PC-1 als auch PC-2 regulieren den Wnt^(80, 81, 82) und JAK-STAT-Signalweg⁽⁸³⁾. PC-2 ist auch über direkte Interaktion mit dem Helix-Loop-Helix-Protein Id2 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, wobei diese Interaktion von PC-1 reguliert wird⁽⁸⁴⁾. All diese Signalwege regulieren (vom Ca^{2+} -Strom unabhängig)

Mechanismen wie Proliferation, Differenzierung, Zellwachstum oder Apoptose und sind auch bei der ADPKD gestört und könnten somit zum Zystenwachstum führen⁽⁵⁾.

Allerdings ist bei Polycystin-2 eine Missense-Mutation (D511V) beschrieben, die zur ADPKD führt und sich (soweit untersucht) nur dadurch auszeichnet, dass es zum Verlust der Ca^{2+} -Leitfähigkeit kommt, was eine Evidenz dafür darstellt, dass der Ca^{2+} -Strom ein zentraler Baustein in der Pathophysiologie der ADPKD ist⁽⁵¹⁾. Weitere Unterstützung findet diese These darin, dass zumindest der mTOR-, MAPK/ERK- und der cAMP-Signalweg entweder nicht in allen Zysten aktiv oder erst in Spätstadien der Zysten hochreguliert sind⁽⁷⁶⁾.

1.4. Bisherige Mausmodelle

Die cDNA des murinen *Pkd2* hat eine hohe „sequence identity“ (91%) und „sequence similarity“ (98%) zur humanen *PKD2*-cDNA und es existieren mehrere Mausmodelle, bei denen *Pkd2* modifiziert wurde.⁽⁸⁵⁾

Wu et al.⁽⁴⁴⁾ kreierte ein Allel, genannt WS25, welches zur homologen Rekombination fähig ist und dadurch ein Nullallel formen kann, was zu einem Knock-out von *Pkd2* in einem Teil der Zellen führt. Auch ein echtes Nullallel wurde kloniert.⁽⁴⁴⁾

Dank dieser Arbeit ist bekannt, dass *Pkd2*^{+/WS25}-Mäuse einen milden Phänotyp zeigen, nur sehr wenige Mäuse entwickeln vereinzelte unilaterale Nierenzysten.⁽⁴⁴⁾

Pkd2^{WS25/WS25}-Mäuse hingegen haben einen ausgeprägten Phänotyp, welcher der humanen ADPKD ähnelt. Viele der Mäuse entwickeln renale Zysten, welche in der Regel dann auch bilateral sind. Einige Tiere weisen auch Leberzysten auf. Wie beim Menschen, entstehen die Nierenzysten aus allen Nephronsegmenten, allerdings überwiegend aus den distalen Abschnitten (zu 40 % aus dem Sammelrohr und zu 42 % aus dem distalen Tubulus).^(44, 86)

Mäuse mit einem *Pkd2*^{+/-}-Genotyp haben, ähnlich wie *Pkd2*^{+/WS25}-Mäuse, einen wenig ausgeprägten Phänotyp, die Anzahl der Mäuse mit Nierenzysten ist aber höher (21% vs. 7%), allerdings sind auch hier die Zysten nur in geringer Zahl und unilateral vorhanden.^(44, 87)

Pkd2^{WS25/-}-Mäuse haben einen ausgeprägteren Phänotyp, nahezu alle Tiere entwickeln bilaterale Nierenzysten und auch Leberzysten. Bei einem *Pkd2*^{-/-}-Genotyp versterben die Tiere bereits *in utero* zwischen dem Embryonaltag 13.5 und der Geburt. Die Embryonen

zeigen eine ausgeprägte Autolyse, teilweise mit Ganzkörperödem, fokalen Einblutungen, Herzfehlbildungen sowie Zysten in Nieren und Pankreas.^(44, 86, 87)

1.5. Vorarbeit des Instituts und Zielsetzung

Um die Beziehung zwischen Leitfähigkeit von Polycystin-2 und Phänotyp weiter zu untersuchen und unter Umständen weitere Evidenz für das Vorhandensein eines Regelkreises zur Definition des Tubulusdurchmessers zu finden, wurden von dem Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg Knock-In-Mäuse erzeugt, bei denen die Porenregion von PC-2 ausgetauscht wurde gegen die Porenregion des murinen PC-2L1-Proteins, einem Protein mit großer Sequenzähnlichkeit zu Polycystin-2, welches ebenfalls als unselektiver Kationenkanal mit großer Leitfähigkeit für Ca^{2+} fungiert^(88, 89). Für den Vergleich der Sequenzen siehe Abbildung 1.3.. Das mutierte Allel wird im Folgenden mit „p“ bezeichnet und das Genprodukt wird bezeichnet als Polycystin-2(mPoreL1). Diese Mäuse wurden auf zwei unterschiedliche genetische Hintergründe zurückgekreuzt: C57BL/6-Mäuse und 129/Sv-Mäuse.

Von den Knock-In-Mäusen war dank Vorarbeiten des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie bereits bekannt, dass die p/p-Mäuse mit 129/Sv-Hintergrund bilateral renale Zysten entwickeln. Die anderen Knock-In-Mäuse zeigten keinen Phänotyp der sich offensichtlich vom Wildtyp unterschied.

Des Weiteren waren bereits Expressionsplasmide konstruiert worden, welche ein Fusionsprotein, bestehend aus dem humanen PC-2 und GCaMP6s, enthielten. Dabei entsprach die Porenregion von Polycystin-2 bei zwei Plasmiden dem des humanen Polycystin-2 und bei zwei Plasmiden dem des humanen Polycystin-2L1, dem humanen Pendant zum murinen Polycystin-2L1⁽⁸⁹⁾. Im Folgenden wird das Polycystin-2-Protein mit Polycystin-2L1-Porenregion mit „Polycystin-2(hPoreL1)“ bezeichnet. Für den Vergleich der humanen Sequenzen der Porenregionen von Polycystin-2 und Polycystin-2L1 siehe ebenfalls Abbildung 1.3.. Diese Plasmide sollten dazu verwendet werden, die Ca^{2+} -Leitfähigkeit zwischen Polycystin-2 und Polycystin-2(hPoreL1) zu vergleichen.

Maus:

Polycystin-2: VFGTQVDDFSTFQECIFTQFRIILGDINFAEIEEANRVLGP

Polycystin-2L1: LFGTQVENFSTFVKCIFTQFRIILGDFDYNAIIDNANRILGP

Polycystin-2(mPoreL1): VFGTQVENFSTFVKCIFTQFRIILGDFDYNAIIDNANRVLGP

Mensch:

Polycystin-2: VFGTQVDDFSTFQECIFTQFRIILGDINFAEIEEANRVLGP

Polycystin-2L1: LFGTQVENFSTFIKCIIFTQFRIILGDFDYNAIIDNANRILGP

Polycystin-2(hPoreL1): VFGTQVENFSTFIKCIIFTQFRIILGDFDYNAIIDNANRVLGP

Abbildung 1.3: Aminosäuresequenzen der Porenregion von Polycystin-2, Polycystin-2L1 und des neuen Proteins Polycystin-2(m bzw. hPoreL1)

Ziel dieser Arbeit war es nun:

- Nachzuweisen, ob das mutierte Allel der Mäuse in mRNA transkribiert wird.
- Nachzuweisen, ob die transkribierte mRNA erfolgreich translatiert wird und ob das entstehende Protein normal intrazellulär lokalisiert.
- Herauszufinden, welche Nephronabschnitte den Ursprung der Zysten in den 129/Sv-p/p-Mäusen darstellen.
- Vergleiche zwischen den Querschnittsflächen der Tubuli von +/- und p/p-Mäusen anzustellen, um weitere Evidenz für das Vorhandensein des Regelkreises zu erhalten.
- Die Klonierung der für die GCaMP-Messungen benötigten Konstrukte abzuschließen.
- Durchführung von GCaMP-Messungen, um die Ca^{2+} -Leitfähigkeit zwischen Polycystin-2 und Polycystin-2(hPoreL1) vergleichen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-log ladder	NEB (#N3200S)
2-Mercaptoethanol	Sigma
6x Loading Dye	NEB
Acrylamid 30%	Serva
Agar = Bacto Agar	Becton Dickinson
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka
BSA = Albumin Fraktion V	Carl Roth
BSA (gelöst, 10 mg/ml) = Purified BSA 100x 10 mg/ml	NEB
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid CaCl₂	Carl Roth
Citronensäure-Monohydrat	Merck
DePeX	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat Na₂HPO₄	Merck
EosinG 1%	Carl Roth
Eisessig/Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol (100%)	Sigma-Aldrich
Ethanol (96%, 80%, 70%)	vom Institut mittels Ethanol 100% selbst verdünnt
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) = Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth
EGTA	Serva
Glucose = D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Sigma-Aldrich (#SZBE125BV)
Hämatoxilin = Hämatoxilinlösung Gill Nr. 3	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt = Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson
HEPES	Carl Roth
Hoechst 33258	Sigma
Isopropanol p.a.	Merck
Kaliumacetat KAc	Merck

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Merck
Kaliumchlorid KCl	Merck
Magnesiumchlorid MgCl_2 = Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Sucofin
Natriumchlorid NaCl	VWR
Natriumhydroxid NaOH	Merck
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
PEI = Polyethylenimin	Polysciences
Ponceau S	Sigma
Roti-Quant	Carl Roth
Salzsäure HCl (1M)	Carl Roth
SDS	SERVA
SIGMAFAST 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten (enthalten 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten und Urea Hydrogen Peroxid Tabletten)	SIGMA
Stickstoff, flüssig	Vom Institut bereitgestellt
Sucrose	Merck
TEMED = Tetramethylethyldiamin	Serva
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris = Trizma Base	Sigma-Aldrich (#SLBJ6588V)
Triton X-100	Carl Roth
Trypsin = Trypsin-EDTA-Lösung 0,25%	Sigma
Trypton = Bacto Trypton	Becton Dickinson
Tween-20	Carl Roth
Wasserstoffperoxid H_2O_2 30%	Merck
Xylol	Merck

2.1.2. Puffer und Lösungen

- 2-log Standard:
 - 100 μl 2-log ladder
 - 167 μl 6x Loading Dye
 - 733 μl H_2O
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10%

- Calcium-Puffer für GCaMP-Messungen:
 - NaCl 150 mM
 - KCl 5 mM
 - CaCl₂ 2,2 mM
 - Glucose 5 mM
 - HEPES 10 mM pH 7,4
 - MgCl₂ 1 mM
 - Sterilfiltriert durch Filtropur
- Calcium-freier-Puffer für GCaMP-Messungen:
 - NaCl 150 mM
 - KCl 5 mM
 - EGTA 2 mM
 - Glucose 5 mM
 - HEPES 10 mM pH 7,4
 - MgCl₂ 1 mM
 - Sterilfiltriert durch Filtropur
- Citratpuffer:
 - Stammlösung A: 0,1 M Citronensäure-Monohydrat
 - Stammlösung B: 0,1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
 - 10 mM Citratpuffer pH 6,0: 9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml H₂O
- Cutsmart-Puffer 10-fach von NEB
- dNTPs 10 mM:
 - 10 µl dATP, 10 µl CTP, 10 µl GTP und 10 µl dTTP (alle aus dem Kit: dNTP Set, 100 mM Solutions)
 - 60 µl H₂O
- HCl-Alkohol 0,1%
- Hoechst (1:5000 in PBS)
- Ethidiumbromid (1 mg/ml)
- EosinG 0,1%:
 - 100 ml/l Eosin G 1% + 1 Tropfen Eisessig pro 100 ml
- Glycerin 50%
- Lysepuffer für Proteinisolation aus Zellen:
 - NaCl 150 mM

- Tris HCl 50 mM pH 8,0
 - Triton X-100 1%
- Lysepuffer für Proteinisolation aus Gewebe (Nieren):
 - Sucrose 250 mM
 - Tris 25 mM pH 8,0
 - EDTA 1 mM pH 8,0
 - Triton X-100 1% (für Membranfraktion wird Triton X-100 zu Beginn weggelassen)
- Mowiol
- PBS 10-fach:
 - NaCl 1,37 M
 - KCl 27 mM
 - Na₂HPO₄ 100 mM
 - KH₂PO₄ 20 mM
- PBS
- PBS-T:
 - 0,1% Tween-20 in PBS
- PEI (1 mg/ml):
 - 50 mg PEI
 - Ad 50 ml H₂O (ca. 50°C warm, um PEI besser zu lösen)
 - pH mit 1 M HCl auf 7,0 eingestellt
 - Steril filtriert
- Ponceau S-Lösung:
 - 0,2% Ponceau S
 - 5% Essigsäure
- Puffer P1 für Mini-Plasmidpräparation:
 - Rnase A 100 µg/ml
 - Tris HCl 50 mM pH 8
 - EDTA 10 mM
- Puffer P2 für Mini-Plasmidpräparation:
 - SDS 1%
 - NaOH 100 mM
- Puffer P3 für Mini-Plasmidpräparation:
 - KAc 3 M pH 5,0

- RotiQuant (1:5 in H₂O verdünnt) von CarlRoth
- SDS 10%:
 - SDS 100g/l in Wasser
- SDS-Probenpuffer 5-fach:
 - Tris-HCl pH 6,7
 - SDS 12,5%
 - 2-Mercaptoethanol 12,5%
 - Bromphenolblau 0,05%
 - Glycerin 50%
- SOC-Medium
- TAE 50-fach:
 - Tris 2 M
 - EDTA 50 mM
 - Essigsäure 1 M (pH auf 8,3 einstellen)
- TAE 1-fach
- Tail-buffer:
 - Tris 100 mM pH 8,0
 - EDTA 5 mM
 - SDS 0,2%
 - NaCl 200 mM
- TE:
 - Tris 10 mM pH 7,4
 - EDTA 1 mM
- Thermopolpuffer 10-fach von NEB
- Transferpuffer für Western Blot:
 - Tris 25 mM
 - Glycin 192 mM
 - SDS 0,025%
 - Methanol 20%
- Tris 0,5 M pH 6,8
- Tris 1,5 M pH 8,8
- Tris-Glycin Elektrophorese Puffer:
 - Tris 25 mM
 - Glycin 192 mM

- SDS 0,1% w/v
- Triton X-100 10%:
 - Triton X-100 100 g/l Wasser
- 4%PFA/PBS
- 5%BSA/PBS:
 - BSA 50 g/l in PBS
- 2%BSA/PBS:
 - BSA 20 g/l in PBS
- 1%BSA/PBS:
 - BSA 10 g/l in PBS
- 5%BSA/0,2%Triton X-100/PBS:
 - BSA 50 g/l und 20 ml/l 10% Triton X-100 in PBS
- 2%BSA/0,2%Triton X-100/PBS:
 - BSA 20 g/l und 20 ml/l 10% Triton X-100 in PBS
- 350 mM NaCL/PBS
- 5%Milchpulver/PBS-T
- 3% H₂O₂:
 - 100 ml/l H₂O₂ 30% in Wasser

2.1.3. Enzyme

2.1.3.1. Restriktionsenzyme

Enzymname	Aktivität [U/ml]	Hersteller
Blp I	10.000	New England Biolabs
Cla I	5.000	New England Biolabs
EcoR V-HF	20.000	New England Biolabs
Fsp I	5.000	New England Biolabs
Nhe I-HF	20.000	New England Biolabs
Psp XI	5.000	New England Biolabs
Spe I-HF	20.000	New England Biolabs
Xho I	20.000	New England Biolabs

2.1.3.2. DNA/RNA-modifizierende Enzyme

Enzymname	Aktivität	Hersteller
Proteinase K	33 U/mg	Amaresco

RNase A (DNase frei)	85,5 U/mg	PanReac AppliChem
T4-DNA-Ligase	400.000 U/ml	New England Biolabs
Taq-Polymerase	5.000 U/ml	New Engalnd Biolabs

2.1.4. Nukleotide

2.1.4.1. Primer

Alle Primer wurden von Metabion produziert

Nummer	Name	Sequenz
#1212	S9 Rev	GGG ATG TTC ACC ACC TG
#1213	S9 Fwd	GCA AGA TGA AGC TGG ATT AC
#2535	PKD2_mRNA_CDS_forward	ATG TCT CGA TGT GCC AAA GAC
#2536	PKD2_mRNA_CDS_reverse	CAG TTT GCC ACC ACC TTG C
#2753	NheI_pkd2 (1218/1224) (<i>for</i>)	TGC ACA AGT TGC TAG CCT C
#3180	PKD2_Ex6_rev	GGA ATC ACA CCA CCT GTT GC
#3181	pIRES_rev	CAC ACC GGC CTT ATT CCA AG
#3349	Pore_neo_rev1	TGT CTC CTA GAA GTG GAA ACC
#3353	GCaMP6_seq_F	GCG CAC CAT CTT CTT CAA GG
#3354	PKD2_Ex4_R	GTC AGC TTC AGT CTG GTT GC
#3355	Pore_neo_uni	CAA GCC GTG TTG AGA TGT TGG
#3365	Actb_F	GAC TTC GAG CAG GAG ATG G
#3366	Actb_R	ACG CAG CTC AGT AAC AGT CC
#3368	PKD2_Ex10_F	TCT GAA GTG AAA TCT GAC TTG GC
#3369	GCaMP6_seq_R	CGG TGG TGC AGA TGA ACT TC
#3451	PKD2_seq_for	GAG TCT GCG GCA AGG AGG
#3459	PKD2_seq_for_2	CAT CTT CCT CCC AAT CTA CA
#3462	qPCR_PKD2_for	TTG AGC ATG TGG CAT ACT GGC
#3463	qPCR_PKD2_rev	GAA GAG GTC TTT GGC ACA TCG

2.1.4.2. Plasmide

pIRES2-DsRed-Express

pcDNA3/PKD2, HA

pcDNA3/PKD2(hPoreL1), HA

pcDNA3/PKD2, HA, GCaMP6s von Melanie Grosch und Patricia Seidel kloniert

pcDNA3/PKD2(hPoreL1), HA, GCaMP6s von Melanie Grosch und Patricia Seidel kloniert

pcDNA3/GCaMP6s, PKD2, HA von Melanie Grosch und Patricia Seidel kloniert

pcDNA3/GCaMP6s, PKD2(hPoreL1), HA von Melanie Grosch und Patricia Seidel kloniert

Im Zuge dieser Arbeit wurden kloniert:

pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s

pIRES2-DsRed-Express/PKD(hPoreL1), HA, GCaMP6s

pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA

pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2(hPoreL1), HA

Für Plasmidkarten siehe Anhang 6.4.

2.1.5. Antikörper und Phalloidin

Primärantikörper:

Name	Antigen	Wirt	Klonalität	Hersteller
12CA5	Ha-Tag (AS 98-106 von Hemagglutinin-Protein)	Maus	Monoklonal	Sigma
A2066	Aktin (C-Terminus; C11)	Hase	Polyklonal	Sigma
Anti-Calbindin	Calbindin-D28-K (aufgereinigt aus Hühnchen)	Maus	Monoklonal	Sigma
Anti-hPKD2-C	Polycystin-2	Hase	Polyklonal	AG Witzgall
Anti-NCC	NCC	Hase	Polyklonal	Mark Knepper
Anti-THP	THP (human)	Hase	Polyklonal	Biotrend
L-9393	Laminin	Hase	Polyklonal	Sigma
SC-9882	AQP2 (C-17) (human)	Ziege	Polyklonal	Santa Cruz
YCC2 (late bleed 169-24w)	Polycystin-2 (human), C-Terminus (Aminosäuren 687–962)	Hase	Polyklonal	Yiqiang Cai und S. Somlo

Sekundärantikörper:

Name	Antigen	Wirt	Gekoppelt mit:	Klonalität		Hersteller
#14	Hase	Ziege	HRP	Polyklonal	IgG (H+L)	Sigma
#369	Ziege	Hase	HRP	Polyklonal	IgG (H+L)	Sigma
#443	Hase	Ziege	Alexa 488	Polyklonal	IgG (H+L)	Invitrogen

#451	Maus	Ziege	Alexa 633	Polyklonal	IgG (H+L)	Life Technologies
#452	Hase	Ziege	Alexa 633	Polyklonal	IgG (H+L)	Invitrogen
#468	Maus	Esel	Alexa 568	Polyklonal	IgG (H+L)	Life Technologies
#469	Hase	Esel	Alexa 568	Polyklonal	IgG (H+L)	Invitrogen
#476	Ziege	Esel	Alexa 488	Polyklonal	IgG (H+L)	Invitrogen

Phalloidin: Acti-Stain 488 Fluorescent Phalloidin von Cytoskeleton

2.1.6. Kits

- dNTP Set, 100 mM Solutions von Thermo Scientific
- E.Z.N.A. Gelextraktion Kit von Omega
- iScript cDNA Synthesis Kit von Biorad
- NucleoSpin RNA von Macherey-Nagel
- SensiFAST SYBR No-ROX Kit von Bioline
- Western Lightning-ECL
- Wizard *Plus* Midipreps DNA Purification System von Promega

2.1.7. Mauslinien

Im Folgenden bezeichnet “+” das Wildtypallel von *Pkd2* und “p” das Allel, bei dem die Porenregion durch die Sequenz der Porenregion von *Pkd2L1* ausgetauscht wurde.

- C57BL/6 +/+
- C57BL/6 +/p
- C57BL/6 p/p
- 129/Sv +/+
- 129/Sv +/p
- 129/Sv p/p

2.1.8. Bakterienstämme und Zelllinien

- TopTen (chemisch kompetent und elektrisch kompetent)
- LLC-PK₁
 - = porcine kidney epithelia cells von Joe Bouventre (Renal Unit, MGH, Boston)
 - Morphologie: Epithelial

- Organismus: *Sus scrofa*
- Gewebe: Niere
- PKD2 -/-
 - Morphologie: Epithelial
 - Organismus: *Mus musculus*
 - Gewebe: Niere, proximaler Tubulus
 - Immortalisiert durch großes SV40 T Antigen

2.1.9. Kulturmedien

- LB-Medium (pH 7,0):
 - NaCl 10 g/l
 - Trypton 10 g/l
 - Hefeextrakt 5 g/l
 - Je nach Verwendung zusätzlich Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 50 µg/ml
- LB-Agar-Platten
 - LB-Medium (u.U. mit Ampicillin oder Kanamycin)
 - Agar 15 g/l
- Medium für LLC-PK₁-Zellen:
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose von Sigma-Aldrich
 - + FCS (für Transfektion ohne FCS) = FBS von PanBiotech
- Medium für PKD2-Knockout-Zellen:
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (ohne L-Glutamin) von Sigma-Aldrich
 - + Insulin (5 mg/l) von Sigma
 - + Interferon (10 U/ml) von Sigma
 - + Pen/Strep (5 ml/l) von Sigma
 - + FCS = FBS (3%) von PanBiotech
 - + Transferrin (5 mg/l) von Sigma
 - + L-Glutamin (200 nM) von Sigma
 - + T3 (1,3 µg/l) von Sigma
 - + Nystatin (5 ml/l) von Sigma
 - + Sodium Selenit (1,3 µg/l) von Sigma

2.1.10. Geräte

	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Horizon 58 Horizontal Gel Electrophoresis System	Life Technologies
	Owl EasyCast B2 Mini Gel Electrophoresis Systems	Thermo Scientific
Autoklaven	Tuttnauer 2540 ML	Tuttnauer
	Tuttnauer 5050 ELV	Tuttnauer
Chemilumineszenz-Kamera	Fusion Fx7	Vilber
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell Total System	Biorad
Gradientenmischer	Gradientenmischer	H.Hölzel
Heizblöcke	HB-LS1	VLM
	Thermomixer 5436	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	HB-1000 Hybridizer Hybridization Oven	UVP
Inkubatoren	CB210	Binder
Inkubationsschüttler	Unitron	HT Infors
Kühlschrank	4°C	Privileg
Gefrierschrank	-20°C	Privileg
	-80°C	Heraeus
Homogenisierer	5ml	B.Braun
Kameras	Axiocam 105	ZEISS
	Olympus PEN lite E-PL3	Olympus
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
	MR HEI-Standard	Heidolph
Magnetrührstäbchen		Brand
Mikroskope	AxioObserver.Z1	ZEISS
	LSM 710	ZEISS
	Olympus SZX12	Olympus
Mikrotome	CM 3050S	Leica
	RM2255	Leica
Mikrowelle	8016 G	Privileg
Mörser und Stößel		Rosenthal
Objektträgerstrecktisch	Typ 12501	MEDAX
pH-Meter	Typ CG 842	Schott
Photometer	Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer	Thermo Scientific

	Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Peristaltik-Pumpe	Minipuls3	Gilson
Pinzetten	Dumoxel 5/45	Dumont
	Dumoxel 7	Dumont
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Ibs
Pipetten	MikroPipetten Discovery 100-1000 µl	HTL ABIMED
	MikroPipetten Discovery 20-200 µl	HTL ABIMED
	MikroPipetten Discovery 2-20 µl	HTL ABIMED
	P1000 Pipetman Classic	Gilson
	P200 Pipetman Classic	Gilson
	P20 Pipetman Classic	Gilson
	P10 Pipetman Classic	Gilson
	P2 Pipetman Classic	Gilson
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammern	MiniProtean Tetra Cell	BioRad
	SE600 Standard Dual Cooled Vertical Unit	Hoefer Scientific Instruments
Rührwerk	Janke&Kunkel RW 14 H	IKA
Schaltnetzgeräte	Consort EV261 Electrophoresis Power Supply	Sigma-Aldrich
	Standard Power Pack P25	Biometra
	Transphor Power Lid TE 50 X	Hoefer Scientific Instruments
Sterilbänke	HA 2448 GS	Heraeus
	Herasafe HS 18	Heraeus Instruments
	Herasafe KS 12	Kendro Heraeus
Thermocycler	LightCycler 480 II	Roche
	Mastercycler gradient	Eppendorf
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen	BL1500S	Sartorius
	KERN 770	Kern & Sohn
Wasserbäder	Paraffin-Streckbad Typ 1052	GFL
	Schüttelwasserbad Typ 1083	GFL
Wärmeschränke	Heraeus T6060	Heraeus Instruments
	Heraeus T6200	Heraeus Instruments

Western Blot-Kammern	TE42 Standard Transfer Tank	Hofer Scientific Instruments
	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
Zentrifugen	Biofuge pico	Heaeus Instruments
	Heraeus Multifuge 3L-R	Kendro Heraeus
	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
	Himac CT15RE	Hitachi
	Optima MAX-E Ultracentrifuge	Beckman Coulter
	Sigma 3K20	B.Braun
Zählkammer	Neubauer, Tiefe 0,1mm	Marienfeld-Superior

2.1.11. Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

- 24-Well = TC-Platte, 24 Well, Standard, F von Sarstedt
- Deckgläschen, rechteckig, 24 mm x 50 mm, High Precision von Marienfeld-Superior
- Deckgläschen, rund, Durchmesser 12 mm von R.Langenbrinck
- Deckgläschen, rund, Durchmesser 22 mm von R.Langenbrinck
- Einmalspritze 5ml Injekt von B.Braun
- Eppendorfgefäße (1,5 ml u. 2 ml) = Reagiergefäß von Sarstedt
- Erlenmeyerkolben von VWR und Schott Duran
- Fettstift Dako Pen von Dako
- GenePulser Küvetten 0,2 cm von Biorad
- Glasflaschen von VWR und Schott Duran
- Halb-Mikro-Küvette aus Polystyrol von Sarstedt
- Filtropur BT50 500 ml 0,2 µm von Sarstedt
- Kanüle Sterican 20G von B.Braun
- Klebefolie, optisch klar von Sarstedt (Im 96-Well-Format)
- Kulturkolben 500 ml von Schott Duran
- LightCycler 480 Multiwell Plate 96 white von Roche
- Objektträger Superfrost Ultra Plus von Menzel-Gläser
- Objektträger 76x26 mm, geschnitten, Mattrand von Carl Roth
- Pasteurpipetten von Brand
- Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (mit und ohne Filter) von Sarstedt
- P6-Schalen = Tissue culture dish 60x15 mm von Sarstedt

- Parafilm „M“ Laboratory Film von Pechiney Plastic Packaging
- PCR-Gefäße = Multiply-Pro Gefäß, 0,2 ml von Sarstedt
- Pipetten, serologisch, Einweg, 5 ml und 10 ml von Sarstedt
- Pipetten, Glas, 5 ml, 10 ml und 20 ml von Blaubrand
- PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm) = Immobilon P von Merck Millipore
- Skalpell
- T75 = TC-Flasche, T75, Standard, Bel.Ka. von Sarstedt
- Ultrazentrifugenröhrchen = Microfuge Tube, Polyallomer von Beckman Coulter
- Whatman Chromatographie Papier Grad 3MM Chr von Sigma
- Zentrifugenröhrchen (Falcon) (15 ml u. 50 ml) von Sarstedt
- Zellschaber 25 cm von Sarstedt

2.1.12. Software

- Adobe Photoshop 7.0 von Adobe Systems
- Editor von Microsoft
- Excel 2013 von Microsoft
- Fusion von vilber
- GENTle von Magnus Manske
- ImageJ von Wayne Rasband
- Lightcycler 480 Software von Roche
- SigmaPlot 12.0 von Systat Software, Inc.
- SPSS 23 von IBM
- Thermo Insight von Thermo Scientific
- WxMaxima 12.04.0 (Open-Source-Projekt)
- ZEN 2010 von ZEISS
- ZEN lite 2011 (blue edition) von ZEISS
- ZEN 2012 von ZEISS

2.2. Methoden

2.2.1. Mausezucht und Genotypisierung

Die Aufzucht und erstmalige Genotypisierung der Mäuse wurde von Melanie Grosch und Marina Wuttke übernommen. Nach der Gewebeentnahme (siehe 2.2.2.) erfolgte eine Re-Genotypisierung, die Methodik hierzu ist unter 2.2.2, 2.2.3, 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben.

2.2.2. Gewebeentnahme aus Mäusen

Aus den zur Gewebeentnahme durch Genickbruch getöteten Mäusen wurden mit Schere und Pinzette die Nieren entnommen, in PBS gewaschen, mittels flüssigem Stickstoffs schockgefroren und danach bei -80°C gelagert.

Des Weiteren wurden auch die Schwanzspitzen der Mäuse abgeschnitten und in einem Eppendorfgefäß auf Eis gelagert, um zur Re-Genotypisierung verwendet zu werden.

2.2.3. DNA-Isolierung

Die zur Genotypisierung abgeschnittenen Schwanzspitzen (siehe 2.2.2.) wurden mit 700 μl Tail Buffer und 7 μL Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 50°C im Hybridisierungssofen unter Rotieren inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, danach wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Überstand wurden 700 μl Isopropanol pipettiert und das Ganze geschwenkt bis die DNA ausfiel. Der ausgefallene DNA-Faden wurde mittels einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß mit 500 μl Ethanol (70%) überführt.

Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert um die DNA zu pelletieren und der Überstand verworfen. Danach trocknete die DNA im Heizblock bei 37°C ca. 5 min.

Dann wurden 80 μl TE-Puffer zum DNA-Pellet pipettiert und abschließend die Proben über Nacht unter Rotieren bei 50°C im Hybridisierungssofen inkubiert, um die DNA zu lösen.

Die Lagerung der gelösten DNA erfolgte bei 4°C .

2.2.4. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus schockgefrorenen Mäusenieren erfolgte (mit Ausnahme der Zentrifugationsschritte) unter der Sterilbank (Herasafe KS 12) mittels NucleoSpin RNA-Kit.

Für eine qualitative Analyse der RNA wurden 30 mg einer Mäuseniere abgewogen und mit einem sterilen Einweg-Skalpell zerkleinert. Danach wurden, gemäß dem Protokoll des Kits, der mitgelieferte Puffer RA1 sowie 2-Mercaptoethanol dazugegeben und die Suspension mittels einer 5 ml Einmalspritze mehrmals durch eine 20 Gauge Kanüle gezogen um sie zu homogenisieren. Die Suspension wurde zur weiteren Homogenisierung und um die Viskosität zu reduzieren mittels Zentrifugieren durch einen NucleoSpin Filter filtriert. Anschließend wurde 350 µl Ethanol (70%) hinzugegeben um das RNA-Bindungsverhalten zu optimieren und die Probe in eine Silica-Membran enthaltende *NucleoSpin RNA Column* überführt. Es folgten mehrere Reinigungsschritte, sowie als Zwischenschritt ein *on-column* DNA-Verdau gemäß dem Protokoll des Kits. Die RNA wurde dann aus der Silica-Membran mit 40 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.5), anschließend wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Für eine vergleichende quantitative Analyse mittels qPCR (siehe 2.2.7.2.) wurden die tiefgefrorenen Nieren zuerst durch Mörsern homogenisiert und von dem erhaltenen Gewebepulver 30 mg abgewogen. Danach wurde verfahren wie bei der RNA-Isolierung für die qualitative Analyse.

2.2.5. Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte photometrisch mittels Nanodrop 2000 Spectrophotometer.

2.2.6. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA (siehe 2.2.4.) erfolgte durch das iScript cDNA Synthesis Kit.

In je ein PCR-Röhrchen wurde pro RNA-Probe folgender Reaktionsansatz pipettiert:

- 5x iScript reaction mix 4 µl
- iScript reverse transcriptase 1 µl
- RNA-Probe x µl (entsprechend Konzentration; m = 1 µg)
- Nuclease-freies Wasser ad 20 µl

Anschließend wurden die PCR-Röhrchen im Thermocycler (Mastercycler gradient) platziert und folgendes Programm gefahren:

- 25°C für 5 min
- 42°C für 30 min
- 85°C für 5 min
- 4°C bis „Enter“ gedrückt wurde

Die erhaltene cDNA-Lösung wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert. (cDNA-Lösungen, die nicht zur qPCR verwendet wurden, wurden noch durch Hinzufügen von 30 µl H₂O verdünnt.)

2.2.7. PCR

2.2.7.1. Konventionelle PCR

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- Vorwärtsprimer (c = 10µM) 0,5 µl
- Rückwärtsprimer (c= 10µM) 0,5 µl
- 10mM dNTP's 0,5 µl
- Thermopolpuffer 2,5 µl
- Taq-Polymerase 0,25 µl
- H₂O 19,75 µl (bei cDNA-Template) bzw. 20,25 µl (bei DNA-Template)
- Template 1 µl (bei cDNA) bzw. 0,5 µl (bei DNA)

Nach dem Pipettieren der Proben wurden diese im Thermocycler platziert und folgendes Protokoll benutzt:

- 94°C 3 min
 - 94°C 30 sec
 - 58°C 1 min
 - 68°C 1 min
 - 68°C 7 min
 - 10°C ∞ (bis „Enter“ gedrückt wurde)
- } 35x

2.2.7.2. qPCR

Um die Menge der in den Nieren enthaltenen *Pkd2*-mRNA quantifizieren zu können, wurde die Methode der qPCR verwendet.

Primermix:

- Vorwärtsprimer (c = 100 µM) 12 µl
- Rückwärtsprimer (c = 100 µM) 12 µl
- H₂O 726 µl

Vor dem Ansetzen der qPCR wurde die cDNA wie folgt verdünnt:

- Für Proben: 0,25 µl cDNA + 4,75 µl H₂O
- Für die Eichgerade:
 - o 0,5 µl cDNA + 4,5 µl H₂O
 - o 0,25 µl cDNA + 4,75 µl H₂O
 - o 0,125 µl cDNA + 4,875 µl H₂O
 - o 0,0625 µl cDNA + 4,9325 µl H₂O

Für jede Probe bzw. jeden Messpunkt der Eichgerade wurden pro Primerpaar drei Reaktionsansätze verwendet. Die Ansätze wurden gemäß folgendem Schema in einer LightCycler 480 Multiwell Plate 96 zusammen pipettiert:

- cDNA (verdünnt, s.o.) 5 µl
- Primermix 5 µl
- SensiFAST SYBR No-ROX mix (2x)
aus SensiFAST SYBR No-ROX Kit 10 µl

Anschließend wurde die Multiwell Plate mit einer optisch klaren Klebefolie verschlossen und für 1 min bei 300 rpm zentrifugiert, um sämtliches Volumen am Boden der Wells zu sammeln.

Die Multiwell Plate wurde im Lightcycler platziert und folgendes Programm gestartet:

- 95°C 7 min

- 95°C 20 sec
- 59°C 20 sec
- 72°C 10 sec

2.2.8. Agarose-Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Proben nach ihrer Größe wurde zuerst ein Agarose-Gel gegossen. Hierzu wurden Agarose und 1-fach-TAE-Puffer zusammen mehrmals in der Mikrowelle aufgekocht, bis sämtliche Agarose in Lösung gegangen war. Anschließend wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (c [Stammlösung] = 1 mg/ml) dazu pipettiert und die Lösung in die Gelkammer (mit Gelschlitten und Kamm) gefüllt.

Verwendet wurden Gele mit 1% Agarose (für DNA-Proben über 1000 Basenpaaren) oder 1,5% Agarose (für DNA-Proben unter 1000 Basenpaaren). Das Volumen des Gels betrug dabei 30 ml, 100 ml oder 150 ml (je nach Anzahl und Volumen der aufzutragenden Proben).

Nach Aushärten des Gels wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel komplett bedeckt war. Dann wurde der Kamm aus dem Gel gezogen und in die nun entstandenen Taschen die Proben (oder der 2-log Standard) aufgetragen. Die Proben waren vorher noch mit 5-fach-Ladepuffer im Verhältnis 1 (Ladepuffer):4 (DNA-Probe) versetzt worden.

Danach wurde die Spannung angelegt (120-140 V), die Katode war dabei mit dem Ende der Gelkammer verbunden, welches näher bei den DNA-Proben war, die Anode am anderen Ende, so dass die negativ geladene DNA durch das Gel zur Anode lief.

Das Gel lief so lange, bis die Laufront des, im Ladepuffer enthaltenen, Bromphenolblaus die Hälfte der Strecke zurückgelegt hatte. Dann wurde der Gelschlitten samt Gel aus der Gelkammer genommen und unter UV-Licht entwickelt.

2.2.9. mRNA-Nachweis mittels Restriktionsenzymverdau

Durch die Mutation der Porenregion (Exon 8-9 von *Pkd2*) wurde eine EcoR V-Schnittstelle entfernt, die im Wildtyp vorhanden war.

Zum Nachweis, dass Wildtyp- bzw. mutierte mRNA vorlag, wurde daher aus Mäusenieren RNA isoliert (siehe 2.2.4), diese in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.6.) und die cDNA als Template für eine PCR (siehe 2.2.7.1.) mit dem Primerpaar #2535/2536 verwendet, welches

einen Bereich von Exon 8 bis Exon 11 auf dem *Pkd2*-Gen amplifiziert. Das Produkt wurde dann mit EcoR V-HF verdaut.

Für das PCR-Produkt aus 129/Sv-Mäusen wurde dabei folgender Ansatz verwendet:

- PCR-Produkt 3 µl
- Cutsmart-Puffer 1,5 µl
- EcoR V-HF 1 µl
- H₂O 9,5 µl

Bei den C57BL/6-Mäusen war die Konzentration des PCR-Produkts für den Verdau nicht ausreichend, so dass hierfür zuerst mehrere PCR-Ansätze gemacht wurden, welche dann mittels Gelextraktion (siehe 2.2.13.3.) aufgereinigt und im Zuge dessen auf einen Ansatz vereinigt wurden, um die Konzentration zu erhöhen. Die Konzentration wurde mittels Nanodrop 2000 Spectrophotometer bestimmt und anschließend 300 ng in den Verdau eingesetzt:

- PCR-Produkt 300 ng
- Cutsmart-Puffer 3 µl
- EcoR V-HF 1 µl
- H₂O ad 30 µl

Der Verdau erfolgte für beide Mausstämme für eine Stunde bei 37°C im Wärmeschrank. Anschließend wurde der Verdau gelelektrophoretisch dargestellt (siehe 2.2.8.).

2.2.10. Proteinisolierung

2.2.10.1. Proteinisolierung aus LLC-PK₁-Zellen

Für Anzucht und eventuelle Transformation der LLC-PK₁-Zellen siehe 2.2.14., generell wurden für jede Proteinisolation zwei dicht mit Zellen bewachsene P6-Schalen verwendet.

Die angewachsenen Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, danach wurden in jede Schale 500 µl PBS pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und die erhaltene Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Dabei wurde immer die Suspension zweier P6-Schalen mit identischen Zellen (s.o.) in einem Eppendorfgefäß vereinigt.

Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das entstandene Zellpellet in 100 µl Lysepuffer resuspendiert (siehe Lysepuffer für Proteinisolation aus Zellen) und für 30 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit dem isolierten Protein in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Die Lagerung des isolierten Proteins erfolgte bei -80°C

2.2.10.2. Proteinisolierung aus Mäusenieren

Eine schockgefrorene Mäuseniere (für Nierenentnahme siehe 2.2.2.) wurde in ein 5 ml-Douncer-Gefäß gegeben und mit 1,5 ml Lysepuffer versetzt (siehe Lysepuffer für Proteinisolation aus Gewebe). Dann erfolgte die Homogenisierung der Niere mittels 5 ml-Douncer und Rührwerk Janke&Kunkel RW 14 H, wobei die Prozedur wie folgt aussah:

Der Douncer-Stab wurde mit Hilfe des Rührwerks zum Rotieren gebracht und dann zehnmal im Douncer-Gefäß rauf und runter geführt. Dann wurde die Probe im Douncer-Gefäß kurz auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde der Douncer-Stab weitere zehn Mal runter und rauf geführt. Das Rührwerk arbeitete dabei auf Stufe 9 von 10.

Nach dem Homogenisieren wurde die Gewebesuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert, um die Zellmembranen durch das im Lysepuffer enthaltene Triton X-100 zu detergieren.

Danach wurde das Lysat für 30 min bei 1.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, welches für 15 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert wurde.

Der Überstand mit dem isolierten Protein wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.10.3. Bradford-Assay

Zur Ermittlung der Konzentration einer Proteinlösung wurde der Bradford-Assay verwendet. Dafür wurde erst mit BSA eine Eichreihe mit folgenden definierten Konzentrationen erstellt:

- 0 mg/ml
- 0,10 mg/ml
- 0,25 mg/ml

- 0,50 mg/ml
- 1,50 mg/ml
- 2,50 mg/ml
- 5,00 mg/ml

Anschließend wurde in 7 Küvetten je 1 ml RotiQuant vorgelegt und je 10 µl der Eichreihen-Lösungen dazu pipettiert. Des Weiteren wurden für jede Probe 1 ml RotiQuant und 5 µl Protein-Lösung in eine Küvette pipettiert. Die Küvetten wurden oben mit Parafilm verschlossen und durch Invertieren gut gemischt.

Danach wurde die Eichreihe erstellt, indem die Absorption der Eichreihen-Lösungen mittels Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer bestimmt wurde. Parallel dazu wurde in dem Programm Thermo Insight die Konzentrationen der Lösungen hinterlegt. Das Programm erstellte automatisch eine Eichgerade aus den Messwerten und den eingegebenen Konzentrationen.

Dann konnten die Proben vermessen und anhand der Eichgerade die Konzentrationen bestimmt werden. Die erhaltenen Konzentrationen mussten noch verdoppelt werden, da in der Eichreihe je 10 µl und bei den Proben je 5 µl Protein-Lösung eingesetzt wurde.

2.2.11. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

2.2.11.1. Polyacrylamidgelelektrophorese

2.2.11.1.1. Gießen eines 8%igen Gels

Die Gelkammer MiniProtean Tetra Cell wurde gemäß Herstellerangaben für das Gießen eines Gels mit 1,5 mm Spacern zusammengebaut. Danach wurde das 8%ige Trenngel hergestellt und 6ml davon in die Kammer gefüllt:

Trenngel:

- | | |
|---------------------|--------|
| - Acrylamid 30% | 2,7 ml |
| - Tris 1,5 M pH 8,8 | 2,5 ml |
| - H ₂ O | 4,6 ml |
| - SDS 10% | 100 µl |
| - TEMED | 4 µl |
| - APS 10% | 100 µl |

Im Anschluss daran wurde das Gel mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um das Gel unter Luftausschluss polymerisieren zu lassen.

Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde der Isopropanol aus der Gelkammer entfernt und die Kante des Trenngels kurz mit Wasser gespült. Dann wurde die Sammelgellösung, welche gemäß folgendem Pipettierschema zusammengestellt wurde, in die Kammer gefüllt:

Sammelgel:

- Acrylamid 30%	530 µl
- Tris 0,5 M pH 6,8	1,0 ml
- H ₂ O	2,4 ml
- SDS 10%	40 µl
- TEMED	4 µl
- APS 10%	40 µl

Der Kamm für die Geltaschen wurde in die Kammer gesteckt und gewartet, bis das Sammelgel polymerisiert war.

Danach wurde die Gelkammer gemäß Herstellerangaben für die Elektrophorese umgebaut und mit Tris-Glycin Elektrophoresepuffer befüllt. Dann wurde das Gel beladen (siehe 2.2.11.1.3.)

2.2.11.1.2. Gießen eines Gradienten-Gels (8%-14%)

Die Gelkammer SE600 wurde gemäß Herstellerangaben zusammengebaut.

Dann wurden für das Trenngel ein 8%ige Lösung und eine 14%ige Lösung gemäß folgendem Pipettierschema hergestellt:

8%ige Lösung:

- Acrylamid 30%	3,75 ml
- Tris 1,5 M pH 8,8	3,5 ml
- H ₂ O	6,7 ml
- Temed	8 µl
- APS 10%	39 µl

14%ige Lösung:

- Acrylamid 30%	6,5 ml
- Tris 1,5 M pH 8,8	3,5 ml
- H ₂ O	3,95 ml
- Temed	8 µl
- APS 10%	39 µl

Anschließend wurde der Gradientenmischer auf einen Magnetrührer platziert und die beiden Röhren des Gradientenmischers mit den Lösungen für das Trenngel befüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass in dem Verbindungsstück zwischen den beiden Röhren keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Das Behältnis mit der 8%igen Lösung war mit einer Peristaltikpumpe verbunden und diese wiederum mit der Gelkammer. Die Verbindung zwischen den beiden Lösungen war zu diesem Zeitpunkt noch geschlossen. In der Röhre der 8%igen Lösung wurde ein Magnetrührstäbchen platziert und der Magnetrührer gestartet. Die Peristaltikpumpe wurde mit 48 rpm gestartet und die Verbindung zwischen der 8%igen und der 14%igen Lösung geöffnet

Nachdem sämtliche Lösung in die Gelkammer gepumpt worden war, wurde das Gel mit 2 ml Isopropanol überschichtet, damit das Trenngel unter Luftausschluss polymerisieren konnte.

Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde der Isopropanol aus der Gelkammer entfernt und die Kante des Trenngels kurz mit Wasser gespült. Dann wurde die Sammelgellösung, welche gemäß folgendem Pipettierschema zusammengestellt wurde, in die Kammer gefüllt:

Sammelgel:

- Acrylamid 30%	1,3 ml
- Tris 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
- H ₂ O	6,1 ml
- TEMED	10 µl
- APS 10%	50 µl

Der Kamm für die Geltaschen wurde in die Kammer gesteckt und gewartet, bis das Sammelgel polymerisiert war.

Danach wurde die Gelkammer gemäß Herstellerangaben für die Elektrophorese umgebaut und die Kammer mit Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer befüllt. Anschließend wurde das Gel beladen (siehe 2.2.11.1.3.).

2.2.11.1.3. Elektrophorese

Die aufzutragenden Proben wurden auf Eis aufgetaut und im Verhältnis 4:1 mit 5-fach SDS-Probenpuffer gemischt. In eine Tasche des Gels wurden 5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder pipettiert, die anderen wurden mit den Proben beladen. Danach wurde die Elektrophoresekammer gemäß Herstellerangaben verschlossen und an eine Spannungsquelle angeschlossen.

Bei einem 8%igen Gel erfolgt die Elektrophorese zunächst bei 80 Volt, bis die Laufront des Bromphenolblaus (im SDS-Probenpuffer enthalten) das Trenngel erreicht hatte. Dann wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht.

Bei einem großen Gradienten-Gel befand sich ein Kühlaggregat, eingestellt auf 10°C, in der Kammer, und der Laufpuffer wurde durch einen Magnetrührer gerührt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 25 Volt über Nacht, am nächsten Morgen wurde die Spannung dann auf 400 Volt erhöht.

Sobald die Laufront des Bromphenolblaus das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet, die Kammer auseinander gebaut, das Gel herausgeholt und dann geblottet (siehe 2.2.11.2.).

2.2.11.2. Western Blot

2.2.11.2.1. Semidry Western Blot

Die Graphit-Platten der Blot-Kammer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell wurden mit destilliertem H₂O äquilibriert. Eine PVDF-Membran wurde zuerst für 1 min in Methanol aktiviert und anschließend kurz in Transferpuffer äquilibriert. Sechs Stücke Whatman Chromatographie-Papier wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert.

Danach wird der Semidry Western Blot wie folgt zusammengebaut:

- Kathode
- 3x Whatman Chromatographie-Papier
- Gel aus Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- PVDF-Membran

3x Whatman Chromatographie-Papier

Anode

Die Blot-Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen, der Blot erfolgte für 60 min bei 22 Volt.

2.2.11.2.2. Wet bzw. Tank-Blot

Eine PVDF-Membran wurde für 1 min in Methanol aktiviert und danach in Transferpuffer äquilibriert, sechs Stücke Whatman Chromatographie Papier wurden ebenso mit Transferpuffer getränkt. Danach wurde die Blot Kammer TE42 mitsamt dem Blot-Sandwich gemäß Herstellerangaben zusammengebaut und mit Transferpuffer befüllt. Anschließend wurde gemäß den Angaben eine Spannungsquelle angeschlossen, der Blot erfolgte für 3 Stunden bei 1 mA.

2.2.11.2.3. Entwickeln des Western Blots

Nach dem Blotten wurde die Membran in eine Plastikschiene gelegt und für 5 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um zu überprüfen, ob der Blot erfolgreich war. Wenn nach der Ponceau S-Färbung Banden auf der Membran zu sehen waren, wurde die Membran mit PBS für ca. 10 min wieder entfärbt.

Die Membran wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver/PBS-T blockiert. Alternativ erfolgte das Blockieren über Nacht bei 4°C.

Anschließend wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler mit den korrespondierenden Primärantikörpern inkubiert, die Antikörper waren dabei in 5% Milchpulver/PBS-T verdünnt.

Danach wurde die Membran einmal für 15 min und zweimal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler, der Sekundärantikörper war ebenfalls mit 5% Milchpulver/PBS-T verdünnt.

Anschließend wurde die Membran erneut einmal 15 min und zweimal 5 min mit PBS-T gewaschen und für 5 min mit der ECL-Substratlösung inkubiert. Die ECL-Substratlösung setzte sich dabei aus 1 ml Western Lightning-ECL Oxidizing Reagent und 1 ml Western Lightning-ECL Enhanced Luminol Reagent zusammen.

Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mittels der Chemilumineszenz-Kamera Fusion Fx7 und der Software Fusion. Die erhaltenen Bilder wurden im TIFF-Format gespeichert.

2.2.11.2.4. Quantifizierung des Western Blots

Die beim Entwickeln der Western Blots erhaltenen TIFF-Bilder wurden mittels ImageJ geöffnet.

Mittels „Rectangle-Selection-Tool“ und „Analyze“ -> „Gels“ -> „Select First Lane“ bzw. „Select Next Lane“ wurden die gewünschten Banden markiert.

Mittels „Analyze“ -> „Gels“ -> „Plot Lanes“ wurde die Bandenintensität graphisch als Peak über einer gewissen Grundintensität dargestellt und durch das „Straight-Tool“ wurden die Grundlinien der Peaks extrapoliert und so von der Grundintensität der Bande separiert. Mit dem „Wand tool“ wurden die (jetzt annähernd dreieckigen Flächen) der Peaks ausgewählt, wodurch ImageJ die Intensitäten der einzelnen Peaks bestimmte.

2.2.12. Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und HE-Färbung

2.2.12.1. Fertigung von Kryo- und Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden mittels Mikrotom RM2255 von Leica aus in Paraffin eingebetteten Mäusenieren gefertigt. Die Schnittdicke betrug dabei 7 µm. Die Schnitte wurden nach dem Schneiden zum Entfalten kurz in ein 40°C warmes Streckbad gegeben und anschließend mit einem Objektträger aufgenommen (Bei Schnitten, die zur Bestimmung der Tubulusdurchmesser benutzt wurden, wurde darauf geachtet, dass alle Schnitte möglichst genau dieselbe Zeit [2 min] im Wasserbad waren). Danach wurden die Schnitte zunächst auf einem Heizblock bei 40°C und darauf folgend über Nacht bei 37°C im Wärmeschränk getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte dann bei 4°C im Kühlschrank.

Die Fertigung der Kryoschnitte erfolgte mittels Kryostat CM3050S von Leica. Die Schnittdicke betrug ebenfalls 7 µm. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte mit einem Objektträger aufgenommen und für 60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -20°C.

2.2.12.2. HE-Färbung an Paraffinschnitten

Als erstes wurden die Schnitte durch 2 x 10 min in Xylol deparaffiniert und anschließend durch folgende absteigende Alkoholreihe rehydriert:

- Ethanol 100% 2 x 2 min
- Ethanol 96% 2 min
- Ethanol 80% 2 min
- Ethanol 70% 2 min
- Ethanol 50% 2 min
- H₂O (bidestilliert) 2 min

Nach dem Rehydrieren wurden die Schnitte für 3 min in Hämatoxylin gefärbt und zum Differenzieren zweimal in 0,1% HCl-Alkohol getaucht. Dann kamen die Schnitte für 10 min unter fließendes Leitungswasser.

Anschließend wurden die Schnitte für 45 Sekunden in 0,1% EosinG (+Essigsäure) getaucht und mit Wasser gespült.

Danach wurden die Schnitte durch folgende aufsteigende Alkoholreihe (und Xylol) dehydriert:

- Ethanol 70% 3 sec
- Ethanol 80% 3 sec
- Ethanol 96% 2 min
- Ethanol 100% 2 x 2 min
- Xylol 2 x 10 min

Abschließend wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckelt.

2.2.12.3. DAB-Färbung an Paraffinschnitten

Zuerst wurden die Schnitte deparaffiniert durch 2 x 10 min in Xylol und rehydriert durch folgende absteigende Alkoholreihe:

- Ethanol 100% 2 x 5 min
- Ethanol 96% 5 min
- Ethanol 80% 5 min
- Ethanol 70% 5 min

Die Schnitte wurden für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen und zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase für 5 min mit 3% H₂O₂ inkubiert. Danach folgte dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser für je 5 min und dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min.

Danach wurden die Schnitte mit 5% BSA/0,2% Triton X-100/PBS für 60 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer blockiert. Die Blockierlösung wurde durch Waschen in PBS entfernt und die Objektträger über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer mit dem in 1% BSA/PBS verdünnten Primärantikörper inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer mit dem in 1% BSA/PBS verdünnten Sekundärantikörper inkubiert.

Daran schloss sich dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min an, währenddessen wurde die DAB-Lösung hergestellt (s.u.), anschließend wurden die Schnitte für 15 min bei Raumtemperatur mit der DAB-Lösung inkubiert (200 µl pro Objektträger).

Nach der Inkubation mit der DAB-Lösung wurde die Lösung mit der Pipette wieder abgenommen und die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gewaschen.

Danach kamen die Objektträger für 7 Sekunden in Hämatoxylin, darauf folgte Spülen mit fließendem Wasser für 10 min. Anschließend wurden die Schnitte für 2 Sekunden in 0,1% Eosin G getaucht und mit destilliertem Wasser gespült.

Dann wurden die Schnitte durch folgende aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert:

- Ethanol 70% 3 sec
- Ethanol 80% 3 sec
- Ethanol 96% 2 min
- Ethanol 100% 2 x 2 min
- Xylol 2 x 10 min

Abschließend wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckelt und bei Raumtemperatur (im Dunkeln) gelagert.

2.2.12.4. Herstellung der DAB-Lösung:

Hergestellt wurde die DAB-Lösung mittels SIGMAFAST 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten, bestehend aus einer DAB- und einer Urea Hydrogen Peroxid-Tablette.

Die Tabletten (zuvor bei -20°C gelagert) wurden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt, anschließend wurde ein 15 ml-Falcon mit 5 ml destilliertem Wasser befüllt und eine DAB-Tablette, sowie eine Urea Hydrogen Peroxid-Tablette hinzugegeben. Danach wurde alles gevortext, bis die Tabletten komplett gelöst waren.

2.2.12.5. Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten

Zunächst wurden die Paraffinschnitte durch Xylol und die absteigende Alkoholreihe deparaffiniert und rehydriert:

- Xylol 2 x 10 min
- Ethanol 100% 2 x 5 min
- Ethanol 96% 5 min
- Ethanol 80% 5 min
- Ethanol 70% 5 min
- Ethanol 50% 5 min

Es folgte zweimaliges Waschen für je 5 min in PBS, danach wurden die Schnitte demaskiert, entweder durch Autoklavieren (30 min bei 121°C) in 10 mM Citratpuffer oder mittels Inkubation mit Proteinase K (20 µg/ml in TE-Puffer) für 10 min bei Raumtemperatur.

Nach dem Demaskieren wurden die Schnitte blockiert durch 5% BSA/PBS für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Es folgte kurzes Waschen in PBS, im Anschluss daran wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer, der Antikörper war in 1% BSA/PBS verdünnt.

Die Schnitte wurden erneut kurz mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer mit dem Sekundärantikörper inkubiert, welcher ebenfalls in 1% BSA/PBS verdünnt war.

Danach wurden die Schnitte mit PBS gewaschen, für 1 min mit Hoechst gefärbt (1:5000 in PBS verdünnt), nochmals in PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt.

Die Aushärtung des Mowiole erfolgte bei 4°C über Nacht.

2.2.12.6. Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten

Die Schnitte wurden auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet. Danach wurden die Schnitte kurz in PBS gewaschen und in einer Feuchtkammer 30 min bei Raumtemperatur mit der Blockierlösung (5% BSA in PBS) blockiert. Nach dem Blockieren wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Der Primärantikörper war in 1% BSA/PBS verdünnt.

Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer, welcher ebenfalls in 1% BSA/PBS verdünnt war.

Die Schnitte wurden kurz mit PBS gewaschen und, falls erforderlich, zur Kernfärbung mit Höchst (1:5000 in 1% BSA/PBS verdünnt) für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Abschließend wurden die Färbungen mit Mowiol eingedeckelt. Das Mowiol härtete über Nacht bei 4°C aus.

2.2.12.7. Immunfluoreszenz an Zellen auf Deckgläschen

Die mit Zellen bewachsenen runden Deckgläschen (siehe 2.2.14.3) wurden in einer 24-Well-Platte platziert (ein Deckgläschen pro Well) und dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 20 min mit 4% PFA/PBS fixiert und dreimal mit PBS gewaschen.

Durch Inkubation mit 2% BSA/0,2% Triton X-100/PBS für 45 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen blockiert und permeabilisiert. Danach wurden die Deckgläschen für 5 min in PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert, welcher in 2% BSA/PBS verdünnt war.

Anschließend wurden die Zellen einmal 5 min mit 350 mM NaCl/PBS und zweimal 5 min mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert, welcher ebenfalls in 2% BSA/PBS verdünnt war. Dann wurden die Deckgläschen dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen.

Abschließend wurden die Zellen für 1 min mit Hoechst gefärbt (1:5.000 in PBS verdünnt), 5 min mit PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt. Zum Eindeckeln wurden die runden Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach oben auf einem Objektträger platziert und mit

Mowiol bedeckt, danach wurde das zum Objektträger korrespondierende Deckgläschen auf den runden Deckgläschen platziert.

Der Objektträger wurde dann zum Aushärten über Nacht bei 4°C gelagert.

2.2.12.8. Bildaufnahme

Die Aufnahme von HE-Färbungen erfolgte mittels Olympus SZX12 und Olympus PEN lite E-PL3.

Zur Aufnahme von Immunfluoreszenz-Färbungen wurde das Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 verwendet.

Die DAB-Färbungen wurden mit AxioObserver.Z1 und Axiocam 105 Color aufgenommen.

2.2.13. Klonierung

2.2.13.1. Klonierungsstrategie

Ausgangspunkt der Klonierung waren folgende Konstrukte:

- pcDNA3/GCaMP6s, PKD2, HA
- pcDNA3/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA
- pcDNA3/PKD2, HA, GCaMP6s
- pcDNA3/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s

Ziel war es, sämtliche Konstrukte vom pcDNA3-Vektor in den pIRES2-DsRed-Express-Vektor zu überführen, um dann während der GCaMP-Messungen (siehe 2.2.15.) anhand der roten Fluoreszenz des DsRed-Express-Proteins eindeutig feststellen zu können, welche Zellen transfiziert waren.

Hierfür wurden die Inserts aus dem pcDNA3-Vektor mittels SpeI und PspXI herausgeschnitten. Während dieses Verdaus kam auch FspI zum Einsatz, da durch SpeI und PspXI neben dem Insert (Größe: 4,7 kbp) noch ein weiteres Fragment mit ähnlicher Größe erzeugt wurde (4,4 kbp, wenn GCaMP6s am 3'-Ende von PKD2 saß und 4,3 kbp, wenn GCaMP6s am 5'-Ende war). FspI verdaute dieses weitere Fragment, so dass während der Gelextraktion sichergestellt war, dass nur das Insert aufgereinigt wurde.

Der pIRES2-DsRed-Express-Vektor wurde mit NheI und XhoI verdaut, wodurch zu SpeI und PspXI kompatible Schnittstellen erzeugt wurden. Danach konnte das Insert mit dem Vektor

ligiert und anschließend in Bakterien transformiert werden. Nach einer Wachstumsphase wurden die Bakterien auf Agar-Platten ausplattiert um einzelne Klone transformierter Bakterien zu erhalten. An mehreren dieser Klone wurde dann, nach einer erneuten Wachstumsphase, eine Mini-Plasmid-Präparation durchgeführt, um mittels Testverdau nach geeigneten Kandidaten für die Sequenzierung zu suchen.

Falls in der Mini-Plasmid-Präparation ein geeignetes Plasmid gefunden wurde, so wurde dieses wieder in Bakterien amplifiziert, mittels Midi-Plasmid-Präparation aufgereinigt und zur Sequenzierung verschickt.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden ausführlich beschrieben.

2.2.13.2. Restriktionsenzymverdau

Zur Gewinnung des Inserts wurde folgender Verdau-Ansatz verwendet:

- | | |
|--------------------|-----------|
| - pcDNA3 | 10 µg |
| - FspI | 1,5 µl |
| - PspXI | 8 µl |
| - SpeI-HF | 3 µl |
| - Cutsmart-Puffer | 15 µl |
| - H ₂ O | ad 150 µl |

Erwartete Banden:

- Bei pcDNA3/GCaMP6s, PKD2, HA und pcDNA3/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA:
4323 bp (Insert) + 2364 bp + 1410 bp + 950 bp + 640 bp
- Bei pcDNA3/PKD2, HA, GCaMP6s und pcDNA3/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s:
4401 bp (Insert) + 2364 bp + 1410 bp + 950 bp + 664 bp + 43 bp

Um den für die Ligation geschnittenen Vektor zu erhalten, wurde ein sequenzieller Verdau angesetzt, beginnend mit XhoI:

- | | |
|------------------------|-----------|
| - pIRES2-DsRed-Express | 10 µg |
| - XhoI | 3 µl |
| - H ₂ O | ad 100 µl |

Der Ansatz wurde dann über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden dann 2 µl gelelektrophoretisch aufgetrennt, um zu überprüfen, ob der Vektor bereits komplett linearisiert war. Erwartet wurde für den geschnittenen Vektor eine 5264 bp große Bande, der ungeschnittene Vektor würde aufgrund einer andersartigen Konformation (z.B. supercoiled) auf einer anderen Höhe laufen.

Falls das Plasmid durch XhoI komplett verdaut (=linearisiert) war, wurde der Verdau mit NheI angesetzt:

- | | |
|--------------------|------------|
| - Verdau mit XhoI | ca. 100 µl |
| - NheI | 3 µl |
| - H ₂ O | ad 200 µl |

Der Ansatz wurde wieder über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nachdem das Insert bzw. der Vektor verdaut waren, konnten sie mittels Gelextraktion aufgereinigt werden (siehe 2.2.13.3.).

2.2.13.3. Gelextraktion

Die Gelextraktion erfolgte durch das „Spin Protocol“ des E.Z.N.A. Gelextraktion Kit, die eingesetzte Menge an DNA betrug 10 µg.

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde mit der zu extrahierenden DNA durchgeführt (siehe 2.2.8.) und die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gel-Fragmente wurden gewogen und gemäß dem beigefügten Protokoll mit „Binding Buffer (XP2)“ versetzt. Danach wurden die Fragmente für 7 min bei 60°C inkubiert und zwischendurch alle 2 min gevortext.

Den Herstellerangaben entsprechend wurde die DNA/Agarose-Lösung in eine „HiBind DNA Mini Column“ überführt, gemäß dem Protokoll mit „Binding Buffer (XP2)“ und „SPW Wash Buffer“ behandelt und durch Zentrifugieren für 2 min bei 13.000 rpm getrocknet. Dann wurden zum Eluieren der DNA 30 µl destilliertes H₂O in die Mitte der Membran der „HiBind DNA Mini Column“ pipettiert, 2 min gewartet und das Röhrchen für 1 min mit 13.000 rpm zentrifugiert.

Die eluierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.13.4. Ligation

Für die Ligation wurde ein Stoffmengenverhältnis von Insert zu Vektor von (ca.) 3:1 verwendet. Da Vektor (5264 bp) und Insert (4323 bp bzw. 4401 bp) ähnliche Größe besitzen, war auch das eingesetzte Massenverhältnis 3:1. Folgender Ansatz wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert:

- Insert 300 ng
- Vektor 100 ng
- T4-DNA-Ligase 1 µl
- 10x T4-DNA-Ligase Puffer X µl (entsprechend Endvolumen des Ligationsansatzes)

Der Ansatz wurde dann über Nacht bei 15°C inkubiert und am nächsten Tag transformiert.

2.2.13.5. Transformation von elektrokompetenten Zellen

Die Transformation der Ligationsansätze (siehe 2.2.13.4.) erfolgte in elektrisch kompetente E.coli Bakterien vom Stamm TopTen. Hierzu wurden 40 µl von zuvor bei -80°C gelagerten TopTen zum Auftauen auf Eis gestellt. 2 µl Ligationsansatz wurden zu den Bakterien pipettiert und anschließend die Bakterien in eine 0,2 cm GenePulser Küvetten überführt. Die Küvette war dabei zum Kühlen vorher kurz auf Eis gestellt worden. Anschließend wurde die Küvette in der Elektroporationskammer des GenePulser Xcell Electroporation Systems platziert und die Elektroporation mittels folgendem vorprogrammierten Protokoll durchgeführt:

E.coli – 2 mm, 2,5 kV

Nach erfolgreicher Schockabgabe wurde 200 µl Soc-Medium in die Küvette pipettiert. Dann wurde der Inhalt der Küvette in ein 15 ml-Falcon, in welchem weitere 800 µl SOC-Medium waren, überführt. Zur Regeneration der Bakterien wurden diese für eine Stunde im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert.

Nach der Regeneration wurden 50 µl und 300 µl der Bakterien-Suspension auf je einer Agar-Platte aus LB-Medium mit Antibiotikum ausplattiert. Für Konstrukte im pcDNA3-Vektor wurde hierbei als Antibiotikum Ampicillin verwendet, bei Konstrukten im pIRES2-DsRed-Express-Vektor wurde Kanamycin verwendet.

Nach dem Ausplattieren wurden die Agar-Platten über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

Wenn am nächsten Tag auf den Agar-Platten Bakterienkolonien gewachsen waren, wurden mehrere davon zum Animpfen einer Mini-Plasmidpräparation verwendet (siehe 2.2.13.6.), danach wurde die Agar-Platte mit den restlichen Kolonien bei 4°C gelagert.

2.2.13.6. Mini-Plasmidpräparation

Zur Überprüfung, ob bei der Ligation und Transformation das richtige Konstrukt entstanden ist, wurde nach der erfolgreichen Transformation eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt.

Zunächst wurden mehrere 4 ml-Kulturen angeimpft. Hierzu wurden einige Kolonien von der Agar-Platte mittels Pipettenspitze aufgenommen und in je ein Glasröhrchen mit 4 ml LB-Medium plus Antibiotikum (Ampicillin für pcDNA3-Plasmide und Kanamycin für pIRES2-DsRed-Express-Plasmide) überführt. Die Bakterien wurden über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden dann für jede 4 ml-Kultur parallel durchgeführt:

Nach der Inkubation wurden 500 µl der Bakteriensuspension zu 500 µl 50% Glycerin pipettiert und als Glycerinstock zunächst bei -20°C, später bei -80°C gelagert. Von der restlichen Suspension wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 13.300 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und weitere 1,5 ml von der restlichen Suspension zum entstandenen Pellet pipettiert. Es folgte erneutes Zentrifugieren für 1 min bei 13.300 rpm und Verwerfen des Überstands.

Das Pellet wurde resuspendiert durch Vortexen mit 300 µl Puffer P1. Danach wurden die Zellen lysiert durch Inkubation mit 300 µl Puffer P2 für 5 min bei Raumtemperatur, wobei das Eppendorfgefäß zum Mischen mehrfach invertiert wurde. 300 µl Puffer P3 wurden hinzugegeben, die Suspension mehrfach invertiert und danach für 5 min auf Eis inkubiert.

Danach wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 13.300 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Überstand wurden 560 µl Isopropanol pipettiert und das Eppendorfgefäß gevortext.

Anschließend wurde der Ansatz bei 13.300 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden zum entstandenen DNA-Pellet 200 µl Ethanol (70%) pipettiert und erneut für 10 min bei 13.300 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder verworfen, wobei verbleibende Flüssigkeitsreste mit der Pipette abgezogen wurden, anschließend wurde das DNA-Pellet für ca. 5 min im Heizblock bei 37°C getrocknet.

Abschließend wurde das DNA-Pellet in 20 µl H₂O gelöst.

2.2.13.7. Testverdau

Nach der Mini- oder Midi-Plasmidpräparation wurde die erhaltene DNA mit NheI-HF verdaut, um auszuschließen, dass es sich nur um den Leervektor handelt, der den Bakterien eine Antibiotikaresistenz verliehen hatte.

NheI wurde gewählt, da eine NheI-Schnittstelle in GCaMP6s und eine in PKD2 bzw. PKD2 (PoreL1) vorkommt. Die NheI-Schnittstelle im pIRES-Vektor, welche für die Klonierung genutzt wurde, war durch die Ligation verschwunden, so dass zwei Fragmente zu erwarten waren:

Erwartete Banden für pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s und pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s: 7879 bp + 1764 bp

Erwartete Banden für pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA und pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA: 7030 bp + 2535 bp

Folgender Ansatz wurde für den Testverdau einer Mini-Plasmidpräparation verwendet:

- DNA 1 µl
- NheI-HF 0,5 µl
- Cutsmart-Puffer 2 µl
- H₂O 16,5 µl

Folgender Ansatz wurde für den Testverdau einer Midi-Plasmidpräparation verwendet:

- DNA 1 µg
- NheI-HF 0,5 µl
- Cutsmart-Puffer 2 µl
- H₂O ad 20 µl

Der Verdau erfolgte in beiden Fällen für zwei Stunden bei 37°C im Wärmeschrank. Anschließend wurde der komplette Verdauansatz (plus 5 µl 5fach-Ladepuffer) gelelektrophoretisch mit einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.13.8. Midi-Plasmidpräparation

Die Midi-Plasmidpräparation erfolgte mittels Wizard Plus Midipreps DNA Purification System.

Eine 100 ml-Kultur der Bakterien wurde angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde in zwei 50 ml-Falcons überführt und bei 4.600 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert um die Bakterien zu pelletieren, der Überstand wurde verworfen. Mit 3 ml „Cell Resuspension Solution“ wurde zunächst das eine Pellet resuspendiert, die Suspension wurde dann zum anderen Pellet überführt und dieses im selben Ansatz resuspendiert. Die Bakterien-Suspension wurde gemäß Herstellerangaben mit „Cell Lysis Solution“ und „Neutralization Solution“ behandelt und für 30 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der DNA-enhaltende Überstand wurde durch ein Kleenex filtriert und mit 10 ml Resin versetzt. Das Vakuum-Sammelrohr wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und die DNA/Resin-Lösung in eine an dem Vakuum-Sammelrohr befestigte Midicolumn überführt. Die Flüssigkeit wurde durch das Anlegen von Unterdruck aus der Midicolumn gezogen. Dann wurde die DNA gemäß dem beigefügten Protokoll gewaschen und getrocknet. Durch das Hinzufügen von 300 µl 65°C warmen H₂O und Zentrifugieren (10.000 g für 20 sec) wurde die DNA eluiert. Die DNA-Lösung wurde für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert, um das verbliebene Resin zu pelletieren, und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.13.9. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma Seqlab übernommen. Für jedes zu sequenzierende Konstrukt wurden mehrere Sequenzierungsprimer benutzt, wobei pro Sequenzierungsprimer folgender Ansatz zu Seqlab geschickt wurde:

- Plasmid 1,2 µg in 12 µl H₂O
- Primer (c = 10 µM) 3 µl

Folgende Primer wurden für pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s und pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s verwendet:

- CMV-forward (Bei Seqlab hinterlegt, wurde daher nicht dazu pipettiert)
- #2753
- #3180
- #3181
- #3368
- #3369

Folgende Primer wurden für pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA und pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA verwendet:

- CMV-forward (Bei Seqlab hinterlegt, wurde daher nicht dazu pipettiert)
- #2753
- #3180
- #3181
- #3353
- #3354
- #3451
- #3459

2.2.13.10. Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Zur chemischen Transformation wurden zu 300 µl der chemisch kompetenten TopTen, welche bei -80°C gelagert waren, 2 µl der DNA aus der Mini- oder Midi-Plasmid-Präparation pipettiert, dann kamen die Bakterien für 30 min auf Eis. Danach folgte ein Hitzeschock in Form von einem 42°C warmen Wasserbad für 30 Sekunden, anschließend kamen die Bakterien erneut für 2 min auf Eis.

200 µl Soc-Medium wurde zu den Bakterien pipettiert, welche dann für eine Stunde bei 37°C regenerieren konnten. Danach wurden 50 µl und 300 µl auf Agarplatten aus LB-Medium ausplattiert, die Verwendung von Ampicillin und Kanamycin erfolgte dabei analog zur elektrischen Transformation (siehe 2.2.13.5.).

Die Agarplatten wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag konnten eine oder mehrere Kolonien zum Animpfen einer Midi-Plasmidpräparation verwendet werden (siehe 2.2.13.8.).

2.2.14. Zellkultur und Transfektion

Sämtliche Arbeitsschritte im Bereich der Zellkultur wurden, sofern nicht anders beschrieben, unter der Sterilbank (HA 2448 GS oder Herasafe HS 18) durchgeführt.

2.2.14.1. Zellkultur

LLC-PK₁-Zellen:

Das Wachstum der LLC-PK₁-Zellen erfolgte in einer T75 mit 10 ml DMEM mit 10% FCS im Inkubator. Die Temperatur betrug 37°C, der Anteil von CO₂ in der Luft im Inkubator betrug 5% und die Luftfeuchtigkeit 100%.

PKD2-Knockout-Zellen:

Das Wachstum der PKD2-Knockout-Zellen erfolgte bei 33°C in einer T75 mit 10 ml DMEM F-12 mit einigen Zusatzstoffen (siehe 2.1.9. Kulturmedien). Im Inkubator betrug der CO₂-Anteil in der Luft 5% und die Luftfeuchtigkeit 100%.

Beide Zelllinien bildeten in den T75 Monolayer aus. Das Wachstum erfolgte so lange, bis die Zellen ca. 100% Konfluenz zeigten, dann wurden sie entweder passagiert oder für weitere Verwendungszwecke ausgesät.

2.2.14.2. Passagieren von (adhärenten) Zellen

Zum Passagieren wurden die Zellen aus dem Inkubator genommen und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin im Inkubator inkubiert, um die Oberflächenkontakte der Zellen zu lösen. Nach ca. 5 min waren alle Zellen abgelöst.

7 ml Medium wurde in die T75 pipettiert und die Zellsuspension mehrmals hoch und runter pipettiert, um die Zellen zu separieren. Anschließend wurde ein Zehntel der Zellsuspension (= 1 ml) in eine neue T75 überführt und 9 ml Medium dazugegeben. Die T75 wurde dann mehrmals geschwenkt, um die Zellen gut zu verteilen und anschließend zum Wachstum der Zellen in den Inkubator gestellt. Die restliche Zellsuspension (= 9 ml) wurde in der Regel verworfen.

2.2.14.3. Aussaat von Zellen zur transienten Transfektion

Für die Transfektion wurden 4×10^5 Zellen aus einer T75 in eine P6-Schale ausgesät.

Hierfür wurde zuerst aus einer T75, in welcher die Zellen ausreichend konfluent waren (50-100%), das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 3 min im Inkubator mit 3 ml Trypsin inkubiert, um sie von der T75 abzulösen. Anschließend wurde 7 ml Medium zu den Zellen pipettiert, die Zellsuspension (nun 10 ml) mit der Pipette aufgenommen und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Aus dem Zentrifugenröhrchen wurden 50 µl für das Auszählen der Zellen abgenommen und in ein Eppendorfgefäß pipettiert, dann wurden die 10 ml Zellsuspension für 5 min bei 300 rpm zentrifugiert.

Während der Zentrifugation wurde die Konzentration der Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Nach dem Auszählen und nachdem die Zentrifugation beendet war, wurde aus dem 50 ml-Zentrifugenröhrchen das Medium abgenommen und die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert.

Von der Zellsuspension wurde ein Volumen, welches 4×10^5 Zellen entsprach, in die P6 pipettiert, das Volumen in der P6 wurde dann auf 5 ml aufgefüllt. Falls benötigt, befanden sich auf dem Boden der P6 runde Glasdeckgläschen (Durchmesser 12 mm, maximal 10 Stück pro P6), auf denen die Zellen anwachsen konnten.

Diese Deckgläschen wurden für die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen und für die GCaMP-Messungen benötigt.

Nach dem Aussäen kamen die Zellen wieder in den Inkubator, die Transfektion folgte dann ggf. am nächsten Tag und die Verwendung der Zellen drei Tage später.

2.2.14.4. Transiente Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgte einen Tag nach dem Aussäen.

100 µl Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ohne FCS) wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend 6 µg des zu transfizierenden Plasmids dazugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde der Ansatz gemischt. 15 µl PEI wurden dazu pipettiert und der Ansatz erneut durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wurde der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde von den für die Transfektion ausgesäten Zellen das Medium abgesaugt und 2 ml neues Medium (mit FCS) dazugegeben. Danach wurde der DNA/PEI-Reaktionsansatz zu den Zellen pipettiert und die Zellen für zwei Tage bei 37°C inkubiert.

Die Verwendung der Zellen (z.B. GCaMP-Messungen oder Proteinisolation) erfolgt dann nach 2 Tagen.

2.2.15. GCaMP-Messungen

2.2.15.1. Vorbereitung

Vorbereitend für die GCaMP-Messungen wurden LLC-PK₁-Zellen in mehrere P6-Schalen mit eingelegten Deckgläschen ausgesät und mit den zu messenden Konstrukten transfiziert (siehe 2.2.14.3. und 2.2.14.4.).

Am Tag der Messung wurde Ca²⁺-Puffer (und falls benötigt Ca²⁺-freier-Puffer) bei 37°C warm gestellt und Vasopressin bzw. ATP zum Auftauen auf Eis gestellt. Des Weiteren wurde das Mikroskop angeschaltet und das Heizsystem auf 37°C vorgewärmt.

Die P6-Schalen mit den Zellen wurden aus dem Inkubator genommen und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend kamen 5 ml des vorgewärmten Ca²⁺-Puffers in die P6-Schalen, welche danach in einen 37°C warmen Wärmeschränk kamen. Die Zellen blieben bis zur Messung bei 37°C im Ca²⁺-Puffer.

2.2.15.2. Messung

Für die Messung wurden am LSM 710 folgende Einstellungen gewählt:

- Mikroskop: LSM 710
- Objektiv: Plan-Apochromat 20x/0.8 M27
- Software: ZEN 2012
- Zeitserie, 1000 Bilder
- Zoom 1,0
- Konfokale Blende: 600 µm
- Laser: 488 nm und 561 nm
- Filter: 493-539 nm und 566-703 nm

Zur Messung kam ein mit Zellen bewachsenes Deckgläschen zuerst in einen (auf 37°C vorgewärmten) Teflon-Kontainer, welcher 990 µl vorgewärmten Ca²⁺-Puffer (oder Ca²⁺-freien-Puffer) enthielt. Die bewachsene Seite zeigte dabei nach oben.

Der Kontainer mit Deckgläschen wurde im dafür vorgesehenen Heizsystem des Mikroskops platziert. Im roten Kanal wurde die richtige Fokusebene eingestellt und mittels des roten DsRed-Signals eine Stelle mit möglichst vielen transfizierten Zellen gesucht.

Anschließend wurde die Zeitreihe gestartet, nach dem zwölften Messzeitpunkt (erkennbar durch den bei jedem Messzeitpunkt aufleuchtenden Laser) wurden 10 µl der Trigger-Substanz in den Kontainer pipettiert (möglichst genau über dem Ort der Aufnahme).

Folgende Trigger-Substanzen kamen zum Einsatz (die angegebene Konzentration entspricht der Endkonzentration in 1 ml Ca^{2+} -Puffer, die Konzentration der 10 µl war demzufolge das Hundertfache):

- ATP 1 µM
- ATP 100 nM
- Vasopressin 1 µM
- Vasopressin 100 nM

Jedes Deckgläschen wurde nur für eine einzige Zeitreihe verwendet und danach entsorgt.

An jedem Messtag wurden immer zwei korrespondierende Konstrukte vermessen, also entweder

pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s und pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s

oder

pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA und pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA.

Wildtyp und mutiertes PKD2 wurden stets im Wechsel gemessen (je ein Deckgläschen Wildtyp, dann ein Deckgläschen Mutante, usw.) um äußere Einflüsse/systemische Fehler wie z.B. Aufenthaltszeit im Ca^{2+} -Puffer vor der Messung oder Halbwertszeit der Trigger-Substanz zu minimieren.

2.2.15.3. Auswertung

Die Einschlusskriterien für eine Zeitreihe waren wie folgt:

- Mindestens eine Zelle zeigte eine Reaktion nach Zugabe der Triggersubstanz
- Bei der Zugabe der Triggersubstanz war keine Verzögerung aufgetreten, wodurch die Zellen erst später hätten reagieren können

- Sollten während der Messung einzelne Zellen oder das ganze Deckgläschen stark gedriftet sein, so wurden diese Zellen von der Auswertung ausgeschlossen.

Die ersten Schritte der Auswertung erfolgten mittels ZEN 2010

Die aufgenommenen Zeitreihe wurden in ZEN 2010 geöffnet und als Darstellung die Option „Mean ROI“ gewählt, dadurch konnte die Änderung der mittleren Farbintensität für einen ausgewählten Bereich über die Zeit graphisch und als Tabelle dargestellt werden.

Durch das DsRed-Signal wurden die Zellgrenzen aller transfizierten Zellen ermittelt und möglichst genau umrahmt. Die Tabelle und der Graph zeigten nun für den roten (DsRed) und den grünen Kanal (GCaMP) den Zeitverlauf.

Danach wurde das DsRed-Signal aus der Auswahl entfernt, so dass nun in der Tabelle nur noch die Werte für das grüne GCaMP-Signal über die Zeit ausgegeben wurden.

Die Tabelle wurde dann als Textdatei (.txt) gespeichert.

Anschließend wurden die Daten der Textdatei in eine Excel-Arbeitsmappe eingefügt.

Nachdem die Daten in Excel eingefügt waren, wurde zunächst der Mittelwert aus den ersten 10 Messzeitpunkten für eine Zelle berechnet, um einen Ausgangswert für die Intensität des GCaMP-Signals vor Zugabe der Triggersubstanz zu erhalten.

Danach wurden sämtliche Messwerte einer Zelle durch diesen Mittelwert geteilt, um so die relative Änderung der Intensität über die Zeit zu erhalten.

2.2.16. Bestimmung der Lumengröße von Tubuli

Zur Bestimmung der Lumenfläche der Tubuli wurden Paraffinschnitte einer Immunfluoreszenzfärbung auf Laminin und einen Nephronsegmentmarker unterzogen (verwendet wurden AQP2 für das Sammelrohr und NCC für den distalen Tubulus, Pars convoluta) (siehe 2.2.12.5.). Die Färbungen wurden mittels LSM 710 aufgenommen und die erhaltenen Bilder in ImageJ geöffnet.

Bei ImageJ wurde unter „Analyze“ -> „Set Measurements...“ die Messgrößen „Area“, „Shape descriptors“ und „Feret’s diameter“ ausgewählt. Anschließend wurde mittels des Werkzeugs „Freehand selections“ zuerst die Außengrenze (identifiziert durch die Laminin-Färbung) eines gewünschten Tubulus umfahren und durch „Analyze“ -> „Measure“ ausgewertet,

anschließend wurde mit der apikalen Grenze des Tubulusepithels auf die gleiche Weise verfahren. Auf diese Art wurden alle gewünschten Tubuli der Reihe nach ausgewertet.

Abgespeichert (als Excel-Datei) wurden dann jeweils die Werte für die Messgrößen „Circularity“ und „Roundness“ bei der Analyse der Tubulusaußenbegrenzung und die Werte „Area“, „Feret“ und „MinFeret“ für die korrespondierende Analyse der apikalen Grenze des Tubulusepithels.

2.2.17. Mathematische und statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der GCaMP-Messungen und der Bestimmungen der Lumengrößen erfolgte mittels SPSS 23 und SigmaPlot 12.0.

Bei der Vorüberlegung, ob bei der Auswertung der Lumengrößen „Circularity“ oder „Roundness“ als Maß für die Rundheit eines Tubulusanschnittes verwendet werden sollte (siehe Ergebnisteil 3.4.3), erfolgte der Plot der Formeln mittels WxMaxima.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war zunächst, nachzuweisen, ob die Knock-In-Mäuse das mutierte Allel transkribieren und translatieren und ob Polycystin-2(mPoreL1) auf physiologische Weise intrazellulär lokalisiert. Darüber hinaus wurde der Phänotyp der Mäuse weiter untersucht, vor allem hinsichtlich des Zystenursprungs bei den Knock-In-Mäusen mit 129/Sv-Hintergrund und ob bei der Größe der Tubuluslumina Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bestehen. Abschließend wurde mittels GCaMP-Messungen die Ca^{2+} -Leitfähigkeit zwischen Polycystin-2 und Polycystin-2(hPoreL1) verglichen, hierfür musste zuerst noch die Klonierung der benötigten Konstrukte abgeschlossen werden.

3.1. Genotypisierung

Um zu gewährleisten, dass bei allen Experimenten die verwendeten Gewebe den richtigen Genotyp aufwiesen, wurden die Mäuse nach der Gewebeentnahme nochmals genotypisiert. (Eine erstmalige Genotypisierung sowie generell die Zucht der Mäuse wurde von Melanie Grosch und Marina Wuttke übernommen).

Die Genotypisierung erfolgte mit genomischer DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse, dabei wurde sich zunutze gemacht, dass bei der Kreierung der Knock-In-Mäuse die embryonalen Stammzellen mittels Antibiotikaresistenz selektiert wurden. In den mutierten Stammzellen fand sich, neben der veränderten *Pkd2*-Sequenz, auch eine Neomycinresistenz-Kassette, welche auf beiden Seiten von einer LoxP-Erkennungssequenz flankiert war, um die Stammzellen auf ihre Mutation hin selektieren zu können. Diese Kassette wurde dann nach der Selektion herausgeschnitten, dabei blieb aber eine LoxP-Site im Genom, so dass das *Pkd2(mPoreL1)*-Allel um 70 bp größer ist als das Wildtyp-Allel.

Durch Verwendung der Primer #3349/3355, welche eine Region amplifizieren, die auch die verbliebene LoxP-Erkennungssequenz einschließt, zeigte sich bei der Wildtyp-Maus (im Folgenden als +/+ bezeichnet) sowohl beim C57Bl/6-, als auch beim 129/Sv-Hintergrund eine Bande in Höhe von 307 bp. Bei den heterozygoten Knock-In-Mäusen (+/p) zeigten sich zwei Banden, eine in Höhe von 307 bp und eine in Höhe von 377 bp, bei den homozygoten Knock-In-Mäusen (p/p) war nur noch die 377 bp Bande zu sehen, welche für das mutierte Allel steht. Abbildung 3.1 und 3.2 zeigen exemplarisch die Genotypisierung der Genotypen +/+, +/p und p/p, sowohl auf dem C57Bl/6- als auch auf dem 129/Sv-Hintergrund.

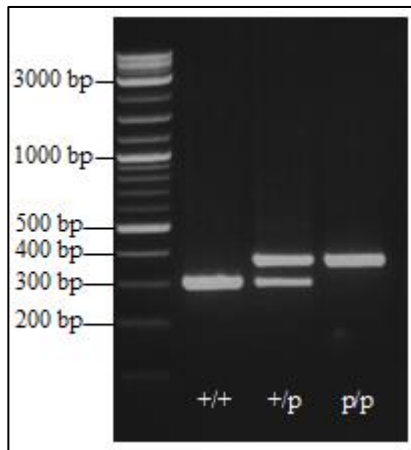


Abbildung 3.1: Genotypisierung der Mauslinie *Pkd2(mPoreL1)* auf C57Bl/6-Hintergrund

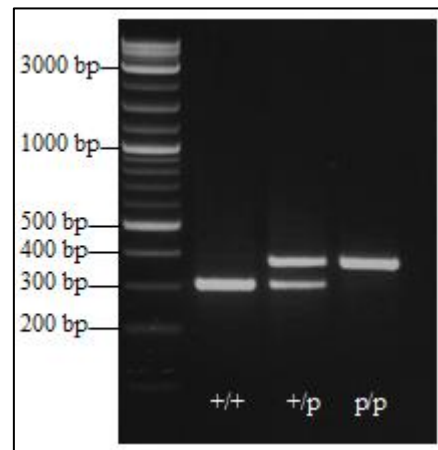


Abbildung 3.2: Genotypisierung der Mauslinie *Pkd2(mPoreL1)* auf 129/Sv-Hintergrund

3.2. mRNA-Nachweis

Um sicherzustellen, dass der Phänotyp der Knock-In-Mäuse auf die veränderte Porenregion und nicht auf eine veränderte Expression des *Pkd2*-Gens zurückzuführen ist, wurde versucht, nachweisen, dass das *Pkd2(mPoreL1)*-Gen durch die Knock-In-Mäuse regelrecht transkribiert wird.

Hierzu wurde RNA aus Mäusenieren isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde zunächst eine konventionelle PCR durchgeführt.

Für die PCR wurden zwei Primerpaare verwendet: #3365/3366 und #2535/2536. #3365/3366 amplifiziert einen Bereich aus dem ubiquitär vorhandenen β -Aktin-Gen, um zu testen, ob die RNA-Isolation und cDNA-Synthese an sich erfolgreich war. Die erwartete Größe der Bande beträgt 487 bp. #2535/2536 amplifiziert einen 441 bp großen Bereich von Exon 8 bis Exon 11 im *Pkd2*-Gen, eine Region, welche auch die Porenregion und damit die veränderte Sequenz umfasst. Beide Primerpaare sind intron-überspannend, wobei bei #2535/2536 der Intronbereich so groß ist, dass bei einer

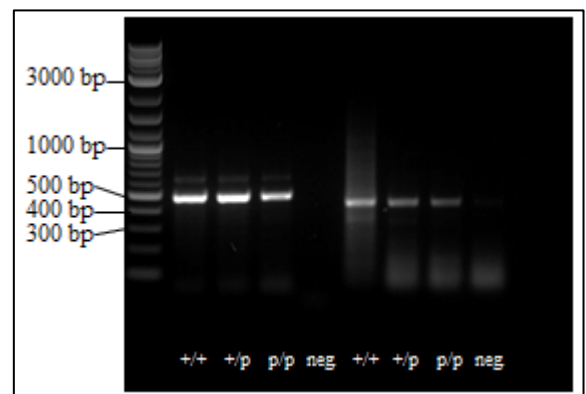


Abbildung 3.3: PCR-Ergebnis für den C57Bl/6-Hintergrund, v.l.n.r. zuerst die Banden für β -Aktin, dann für *Pkd2*

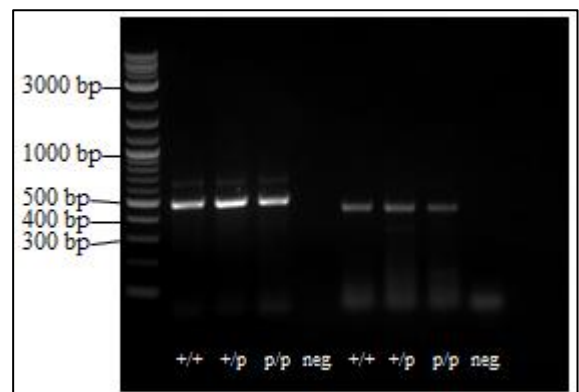


Abbildung 3.4: PCR-Ergebnis für den 129/Sv-Hintergrund, v.l.n.r. zuerst die Banden für β -Aktin, dann für *Pkd2*

eventuellen Verunreinigung mit genomischer DNA trotzdem von dieser keine Bande zu erwarten wäre. Bei #3365/3366 ist der Intron-Bereich nur ca. 200 bp lang, so dass hier genomische DNA eine höher laufende Bande erzeugen würde.

Abbildung 3.3 und 3.4 zeigen das Ergebnis der PCR für die genetischen Hintergründe C57Bl/6 und 129/Sv einschließlich Negativkontrollen.

Man sieht anhand der vorhandenen Banden für β -Aktin, dass bei beiden Hintergründen die mRNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgreich war, auch wenn die ca. 200 bp höher laufenden Banden für eine Verunreinigung mit genomischer DNA sprechen, vermutlich durch einen unvollständigen DNA-Verdau während der RNA-Isolation.

Auch die Banden für Exon 8 bis 11 von *Pkd2* waren bei beiden Mauslinien für alle Genotypen vorhanden, auch wenn die Intensität der Banden vor allem bei den p/p-Mäusen schwächer wirkte als bei den +/+ -Mäusen.

Um zu beweisen, dass die Banden von *Pkd2* wirklich vom *Pkd2(mPoreL1)*- bzw. Wildtyp-Allel erzeugt wurden, wurde das PCR-Produkt des Primerpaares #2535/2536 mit dem Restriktionsenzym EcoRV verdaut. Dabei wurde sich zunutze gemacht, dass im Wildtyp-Allel eine EcoRV-Schnittstelle vorhanden ist, welche das 441 bp Fragment in einen 279 bp und einen 162 bp großen Teil zerlegt. Diese Schnittstelle ist bei *Pkd2(mPoreL1)* nicht mehr vorhanden.

Abbildung 3.5 und 3.6 zeigen das Resultat des EcoRV-Verdaus für beide genetischen Hintergründe. Bei beiden sieht man beim +/+ -Genotyp die erwarteten 279 bp- und 162 bp-Bande, beim +/p-Genotyp Banden in Höhe von 441 bp, 279 bp und 162 bp und bei p/p-Genotyp nur die 441 bp-Bande, was zeigt, dass das *Pkd2(mPoreL1)*-Allel erfolgreich in mRNA umgeschrieben wurde.

Anschließend wurde eine qPCR durchgeführt, um zu prüfen, ob die mRNA-Konzentrationen vergleichbar sind. Verwendet wurden hierbei das Primerpaar #1212/1213, welches das

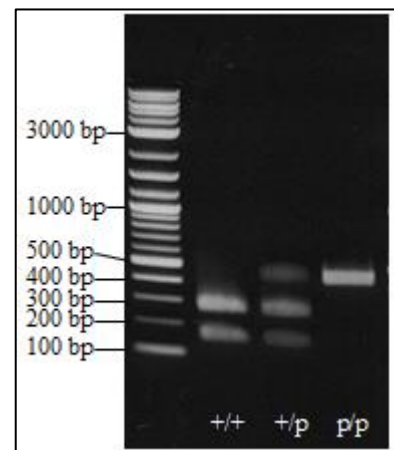


Abbildung 3.5: Eco-RV-Verdau des genetischen Hintergrunds C57Bl/6

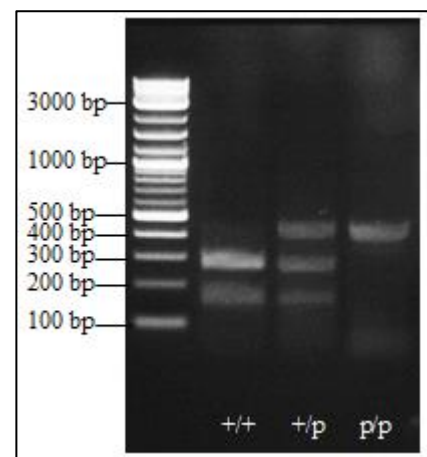


Abbildung 3.6: EcoRV-Verdau des genetischen Hintergrunds 129/Sv

Referenzgen *S9* amplifiziert, und das Primerpaar #3462/3463, welches (intronüberspannend) Teile der *Pkd2*-mRNA amplifiziert.

Da Polycystin-2 in der Niere nicht homogen verteilt, sondern vor allem im distalen Tubulus und im Sammelrohr vertreten ist⁽⁷⁵⁾, wurden bei der qPCR die Nieren zuerst mittels Mörsern homogenisiert, das erhaltene Gewebepulver einer RNA-Isolation unterzogen und die erhaltene RNA für die qPCR verwendet. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass der Anteil der verschiedenen Nephronabschnitte in den jeweiligen Proben (annähernd) identisch war.

Abbildung 3.7 und 3.8 zeigt die Auswertung der qPCR für alle Genotypen und Hintergründe. Man sieht, dass bei beiden genetischen Hintergründen die relative Konzentration der mRNA bezogen auf die Konzentration der *S9*-mRNA beim $+/+$ Genotyp am höchsten war, bei den heterozygoten Knock-In-Mäusen dann abnahm (Auf 93% bei C57Bl/6 und 62% bei 129/Sv) und bei den homozygoten Knock-In-Mäusen am geringsten war (28% bei C57Bl/6 und 30% bei 129/Sv, bezogen auf den Wert der jeweiligen Wildtyp-Mäuse).

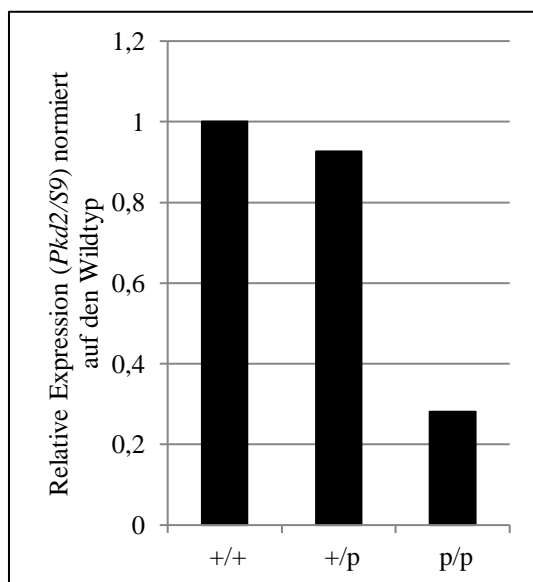


Abbildung 3.7: Ergebnis der qPCR des C57Bl/6-Hintergrunds

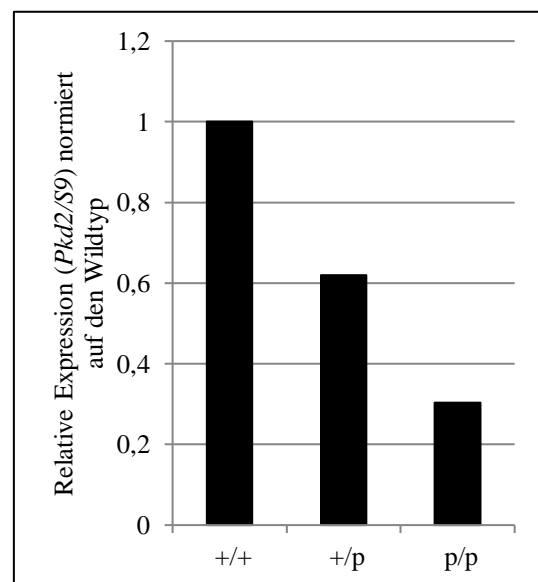


Abbildung 3.8: Ergebnis der qPCR des 129/Sv-Hintergrunds

Die Ergebnisse des mRNA-Nachweises legen somit nahe, dass die mRNA des Pore-Allels zwar transkribiert wird, die mRNA-Spiegel aber geringer ausfallen als beim Wildtyp.

3.3. Protein-Nachweis

Da veränderte mRNA-Spiegel nicht zwangsläufig zu einer veränderten Proteinmenge führen, bedingt durch verschiedene Regulationsebenen, wurde anschließend die Translation und intrazelluläre Lokalisation von Polycystin-2(mPoreL1) überprüft.

Zum Nachweis der Translation des mutierten Polycystin-2 wurde eine Proteinisolation an ganzen Mausnieren durchgeführt und anschließend mit 100 µg des Proteinlysats eine SDS-PAGE vollzogen, welche dann auf eine PVDF-Membran geblottet wurde. Der Blot wurde mit dem gegen den C-Terminus (Aminosäuren 687–962) von Polycystin-2 gerichteten Antikörper YCC2⁽⁴⁴⁾ (1:4000) und einem Antikörper gegen Aktin (A2066, 1:2500) als Ladekontrolle gefärbt.

In Abbildung 3.9 und 3.10 ist das Ergebnis des Western Blots für alle Genotypen und genetischen Hintergründe einschließlich Negativkontrollen (100 µg Proteinlysate von *PKD2*-Knock-out-Zellen) dargestellt. Anhand der für alle Proben vorhandenen Aktin-Bande bei 42 kD erkennt man den erfolgreichen Ablauf von Proteinisolation und Western Blot und dass in allen Spuren vergleichbare Mengen Protein geladen waren. Bei der Polycystin-2-entsprechenden 110 kD Bande sieht man bei beiden genetischen Hintergründen ein gutes Signal für die Wildtyp-Mäuse, welches in der Intensität bei den heterozygoten Knock-In-Mäusen abnimmt und bei den homozygoten Knock-In-Mäusen nur noch schwach vorhanden ist.

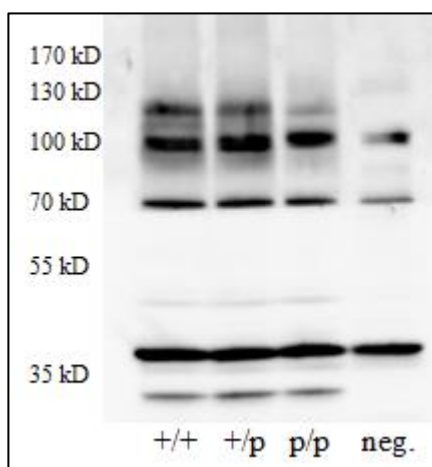


Abbildung 3.9: Western Blot von Proteinlysaten aus Nieren mit C57Bl/6-Hintergrund, gefärbt auf Polycystin-2 und β -Aktin

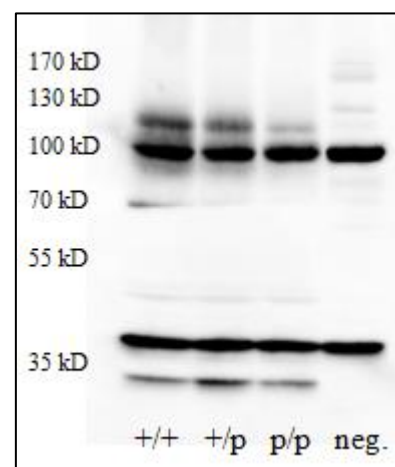


Abbildung 3.10: Western Blot von Proteinlysaten aus Nieren mit 129/Sv-Hintergrund, gefärbt auf Polycystin-2 und β -Aktin

Die nachfolgende Quantifizierung der Polycystin-2 Bande des Western Blots bestätigt den optischen Eindruck:

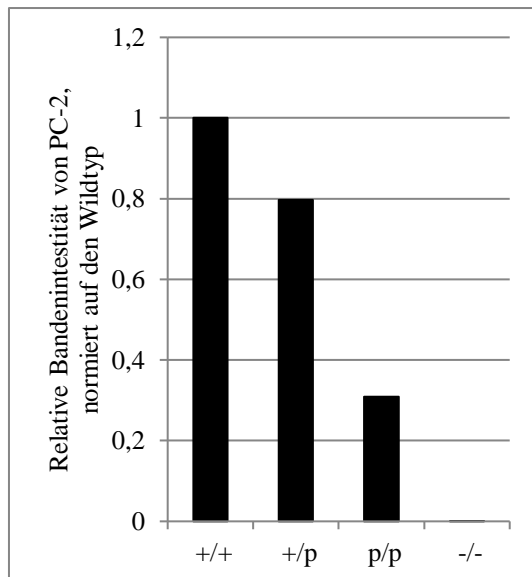


Abbildung 3.11: Ergebnis der Quantifizierung der Polycystin-2-Bande des C57Bl/6-Hintergrunds

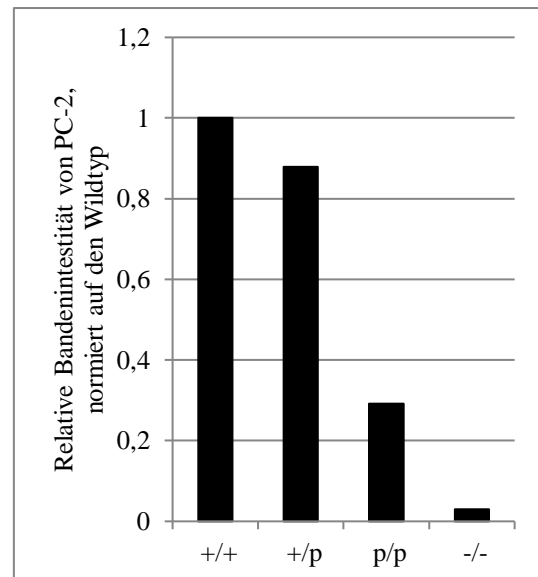


Abbildung 3.12: Ergebnis der Quantifizierung der Polycystin-2-Bande des 129/Sv-Hintergrunds

	C57Bl/6	129/Sv
+/+	1,00	1,00
+/p	0,80	0,88
p/p	0,31	0,29

Tabelle 3.1: Werte der relativen Quantifizierung der Polycystin-2-Bande, normiert auf den Wildtyp, für beide genetischen Hintergründe

Das Ergebnis der Quantifizierung zeigte erniedrigte Spiegel des Polycystin-2(mPoreL1)-Proteins im Vergleich zum Wildtyp-Protein und war somit kongruent mit dem Ergebnis der qPCR. Auch das Ausmaß des Unterschieds war vergleichbar zur qPCR (bei beiden genetischen Hintergründen war sowohl bei der qPCR als auch beim Western Blot die relative Menge beim p/p-Genotyp ca. 30% im Vergleich zum Wildtyp).

Anschließend wurde überprüft, ob das mutierte Protein auf die gleiche Weise intrazellulär lokalisiert wie das Wildtyp-Protein. Zu diesem Zweck wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung mit dem YCC2-Antikörper (1:200) auf in Paraffin eingebetteten Mausnieren (Alter 6 Monate) durchgeführt.

Das Resultat ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Man sieht bei allen Färbungen eine basal betonte Verteilung, welche eine retikuläre Zeichnung aufweist. Dieses Muster ist auch typisch

für die Verteilung des endoplasmatischen Retikulums, welches die hauptsächliche intrazelluläre Lokalisation von Polycystin-2 ist⁽¹³⁾.

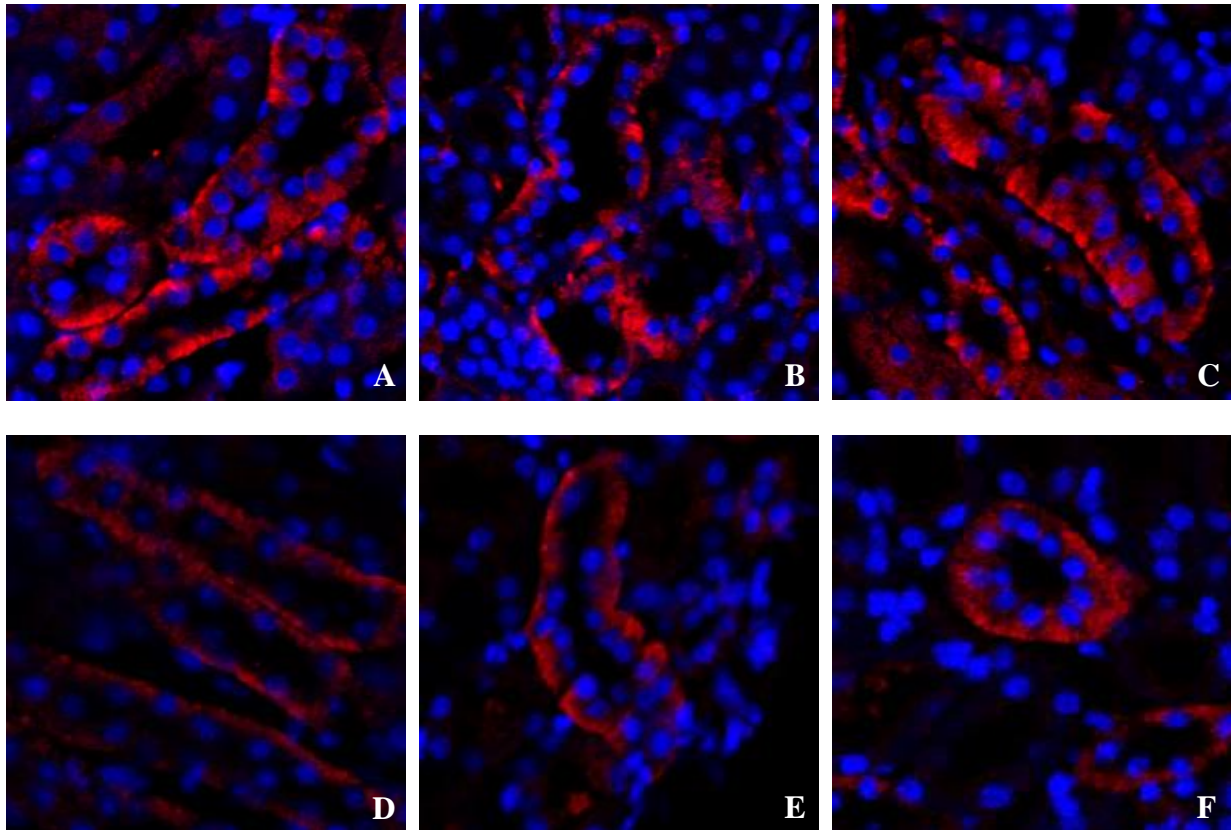


Abbildung 3.13: Immunfluoreszenzfärbung auf Polycystin-2 bei Paraffinschnitten; 200-fache Vergrößerung, rot: YCC-2-Färbung (= Polycystin-2). **A:** C57Bl/6-Hintergrund, ++-Genotyp, Nierenrinde. **B:** C57Bl/6-Hintergrund, +/p-Genotyp, Nierenrinde. **C:** C57Bl/6-Hintergrund, p/p-Genotyp, Nierenrinde. **D:** 129/Sv-Hintergrund, ++-Genotyp, Nierenrinde. **E:** 129/Sv-Hintergrund, +/p-Genotyp, Nierenrinde. **F:** 129/Sv-Hintergrund, p/p-Genotyp, Nierenrinde.

Zusammenfassend lässt sich zum Protein-Nachweis festhalten, dass es Evidenz für die regelrechte Translation des mutierten Proteins gibt und es voraussichtlich auf physiologische Weise intrazellulär lokalisiert. Die verringerten Mengen im Vergleich zum Wildtyp, welche bereits beim mRNA-Nachweis auffielen, bestätigten sich zwar, es wurde jedoch keine Vergrößerung des Unterschiedes festgestellt.

3.4. Phänotyp der Knock-In-Mäuse

3.4.1. Allgemeines

Die Beurteilung des Phänotyps der Knock-In-Mäuse erfolgte in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie des Instituts für Anatomie der Universität Regensburg. In Paraffin eingebettete Nieren der Knock-In-Mäuse verschiedener Altersstufen wurden bereitgestellt. Es zeigte sich, dass Mäuse mit dem Genotyp +/p bei beiden genetischen Hintergründen keinen Phänotyp aufwiesen, der sich vom Wildtyp unterscheiden ließ. Insbesondere entwickelten die Mäuse (bis zum Alter von 12 Monaten)

keine Zysten in Nieren, Pankreas oder Leber. Auch bei den p/p-Mäusen auf dem C57Bl/6-Hintergrund waren keine auffälligen Veränderungen zu erkennen, insbesondere auch wieder keine Zystenentwicklung (bis zum Alter von 12 Monaten). Die p/p-Mäuse auf dem 129/Sv-Hintergrund zeigten zwar auch keine Zysten in Pankreas oder Leber, allerdings entwickelten sie multiple bilaterale Nierenzysten.

Hier dargestellt ist eine Zeitreihe, die die Entwicklung des renalen Phänotyps zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monate bei den 129/Sv-p/p-Mäusen zeigt. (Siehe Abbildung 3.14, für größere Abbildungen siehe Anhang)

Des Weiteren wurden von 20 Tieren dieser Mauslinie (3 im Alter von 3 Monaten, 5 im Alter von 6 Monaten, 6 im Alter von 9 Monaten und 6 im Alter von 12 Monaten) auf insgesamt 58 Schnitten (sowohl HE-Färbungen, als auch Immunfluoreszenzfärbungen) die Nierenzysten ausgezählt, das Ergebnis ist in Abbildung 3.15 dargestellt. In der Zusammenschau der beiden Darstellungen erkennt man, dass Größe und Anzahl der Zysten mit dem Alter der Tiere tendenziell etwas stiegen, muss aber auch festhalten, dass es bei den Tieren große interindividuelle Unterschiede bezüglich der Zystenentwicklung gab. Teilweise hatten jüngere Tiere größere und mehr Zysten als ältere Tiere.

In den HE-Färbungen sieht man auch, dass die Lokalisierung der Zysten sich überwiegend auf die Nierenrinde beschränkte, nur vereinzelt waren Zysten im Nierenmark zu finden. Des

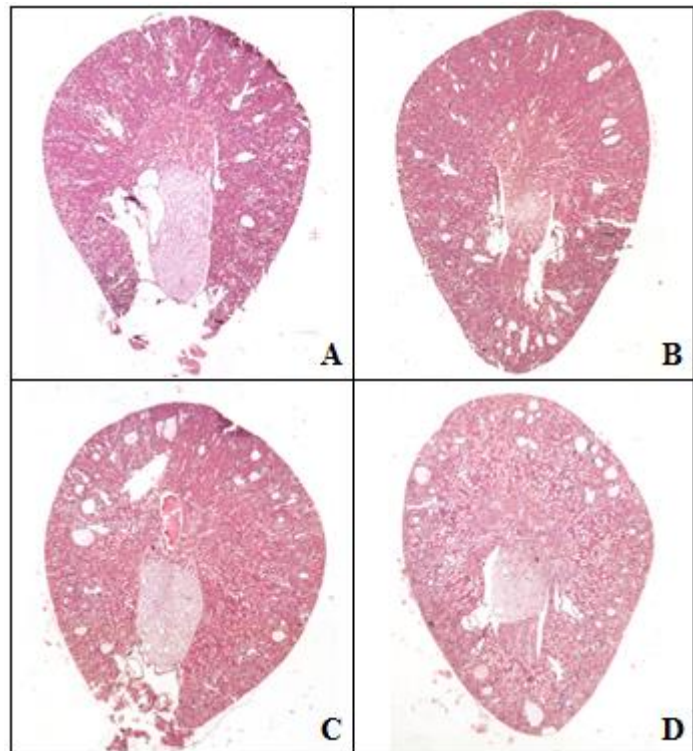


Abbildung 3.14: HE-Färbung von Nierenschnitten des Genotyps p/p auf dem 129/Sv-Hintergrund. **A:** 3 Monate altes Tier. **B:** 6 Monate altes Tier. **C:** 9 Monate altes Tier. **D:** 12 Monate altes Tier

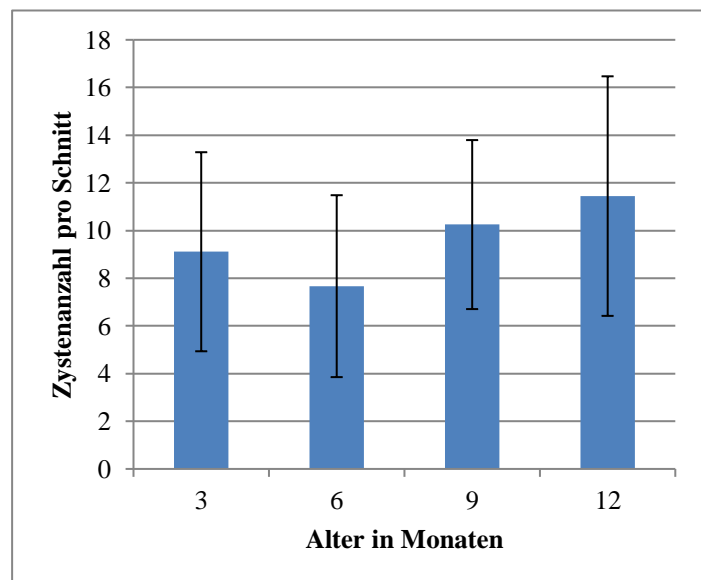


Abbildung 3.15: Ergebnis der Auszählung der Zysten pro Schnitt bei der p/p-Mauslinie auf 129/Sv-Hintergrund

Weiteren fällt auf, dass die Nieren älterer Tiere wirken, als wären auch die nicht-zystischen Abschnitte des Tubulussystems weiter als bei jüngeren Tieren. Vor allem im Papillen-Bereich ist diese Beobachtung auffällig, teilweise wirkt die Papille regelrecht schwammig (siehe Abbildung 3.16).

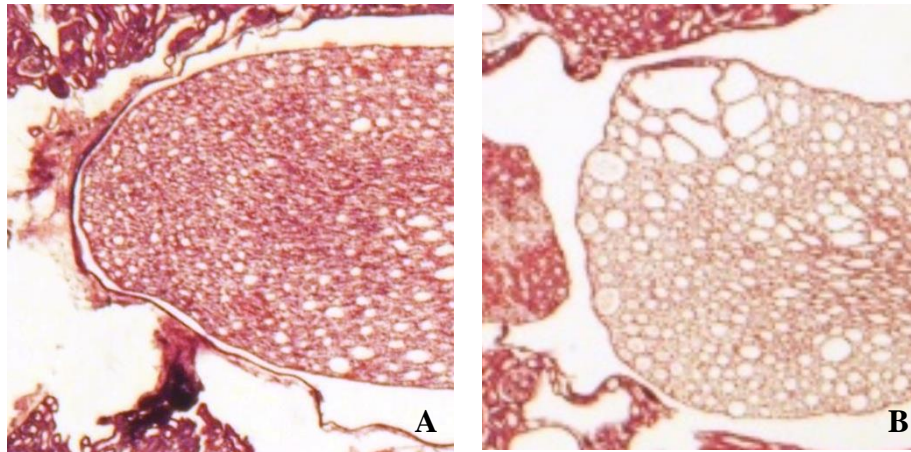


Abbildung 3.16: HE-Färbung der Mauslinie p/p auf 129/Sv-Hintergrund. **A:** Nierenpapille eines 3 Monate alten Tieres. **B:** Nierenpapille eines 12 Monate alten Tieres.

Festzuhalten bleibt, dass es bei den p/p-Mäusen auf 129/Sv-Hintergrund zur Ausbildung multipler Nierenzysten kam. Die Größe und Anzahl dieser Zysten war aber relativ milde und nicht zu vergleichen mit humanen Nieren im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz bei ADPKD. Es ließ sich auch nicht beobachten, dass Mäuse an einem Nierenversagen starben. Des Weiteren zeigte sich bei den p/p-Mäusen keine erhöhte Rate an Todgeburten, was einen Hinweis darauf darstellt, dass das neue Protein funktionstüchtig ist, da *Pkd2*-Knock-out-Mäuse noch *in utero* versterben^(44, 86, 87).

3.4.2. Bestimmung des Zystenursprungs

Da die homozygoten Knock-In-Mäuse auf 129/Sv-Hintergrund nahezu alle Zysten entwickelten, wurde als nächstes versucht, zu ermitteln, welche Nephronsegmente die Ursprünge der Zysten darstellten. Hierfür wurden zunächst in Paraffin eingebettete Nieren dieser Mäuse (Alter 3-12 Monate) einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-AQP2-Antikörper (SC-9882, 1:200) und einem anti-Calbindin-Antikörper (Gegen Calbindin-D28-K gerichtet, 1:4000) unterzogen. AQP2 fungierte dabei als Marker für das Sammelrohr und Calbindin als Marker für den distalen Tubulus, Pars convoluta, und den Verbindungstubulus^(90, 91, 92). Insgesamt wurden 19 Nieren von 19 verschiedenen Tieren auf diese Weise gefärbt und ausgewertet (1 Schnitt pro Niere), wobei insgesamt 189 Zysten beobachtet werden konnten. Sämtliche beobachteten Zysten waren dabei positiv für den Sammelrohrmarker

AQP2, eine Calbindin-positive Zyste konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren zeigte die AQP2-Färbung in allen Zystenepithelien eine (physiologische) apikale Lokalisation, mit Ausnahme einiger AQP2-negativen Zellen bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Schaltzellen des Typus A oder B handelte.

Abbildung 3.17 zeigt exemplarisch einige Aufnahmen von AQP2-positiven Zysten. Besonders erwähnenswert sind Abbildung 3.17 C und D, bei denen man einen Tubulusabschnitt erkennen kann, der zuerst noch eine Co-Färbung für AQP2 und Calbindin aufweist und bei dem die Zystenstruktur genau an der Stelle beginnt, an der die Calbindin-Färbung aufhört. Des Weiteren kann man das schon beschriebene apikal-betonte Verteilungsmuster von AQP2 beobachten.

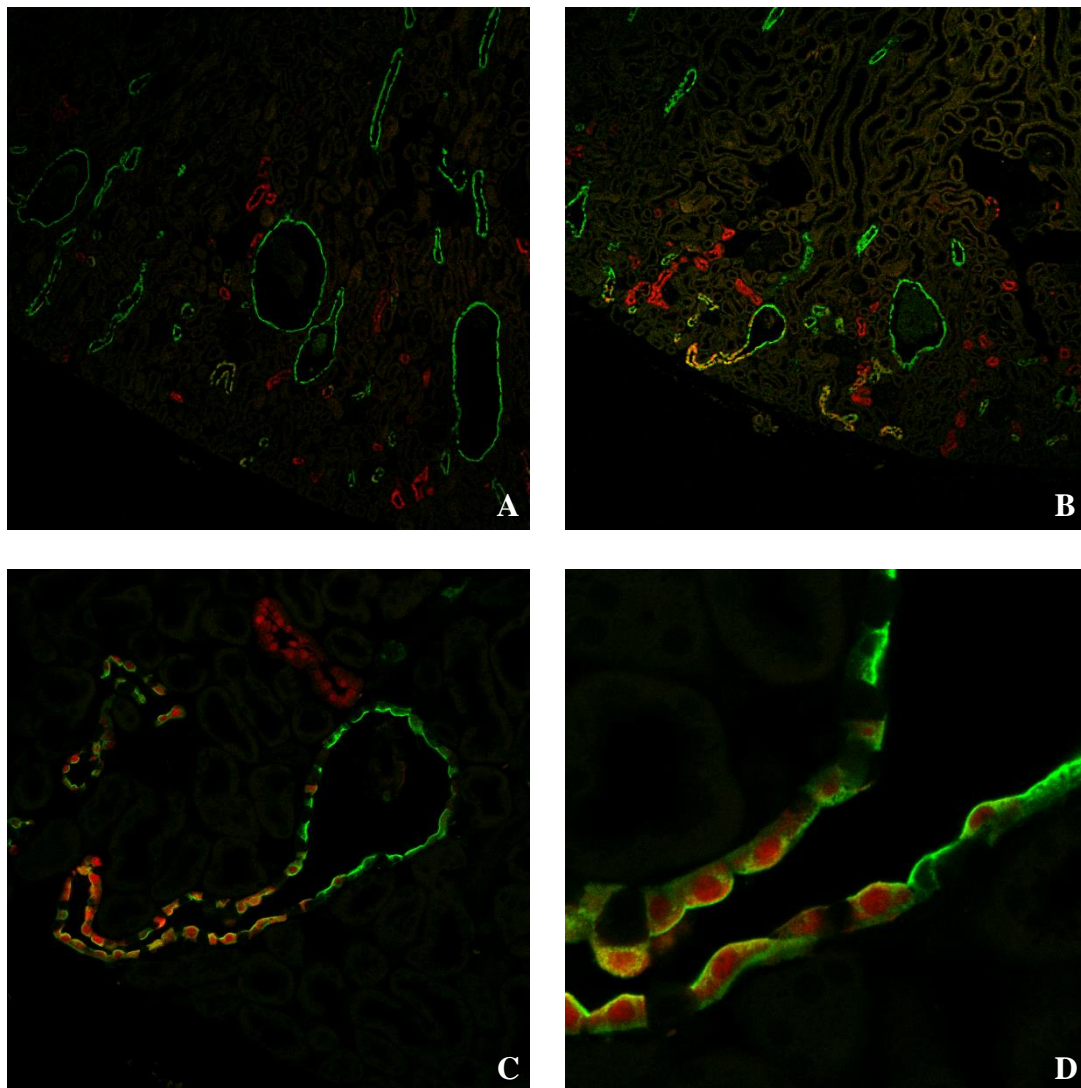


Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzfärbung auf Paraffinschnitten von 129/Sv-p/p-Nieren, grün: AQP2, rot: Calbindin. **A, B:** 60-fache Vergrößerung, **C:** 240-fache Vergrößerung, **D:** 800-fache Vergrößerung

Nachdem nun Färbungen auf die Tubulusabschnitte Sammelrohr und distaler Tubulus, Pars convoluta, vorlagen, war es nötig, Färbungen mit Markern für den proximalen Tubulus und

den distalen Tubulus, Pars Recta, durchzuführen. Eine Färbung für den Intermediärtubulus wurde unterlassen, vor dem Hintergrund, dass sich die Zysten auf die Nierenrinde beschränkten, während der Intermediärtubulus ausschließlich im Nierenmark zu finden ist.

Da die Antikörper gegen die gewählten Tubulusmarker für den distalen Tubulus, Pars recta (Tamm-Horsefall-Protein) und den proximalen Tubulus (Phalloidin als Bürstensaummarker) auf Paraffin-Schnitten nicht funktionierten, wurde stattdessen die Färbung von Kryo-Schnitten homozygoter 129/Sv-Knock-In-Mäuse durchgeführt (anti-THP in der Konzentration 1:200 und Phalloidin 3:1000)⁽⁹³⁻⁹⁷⁾. Im Zuge dessen wurde auch eine erneute Immunfluoreszenz mit den schon verwendeten anti-AQP2- und anti-Calbindin-Antikörpern durchgeführt.

Gefärbt wurden Serienschritte mit 7 µm Abstand von 3-12 Monate alten homozygoten 129/Sv-Knock-In-Mäusen. Dabei wurde ein Schnitt auf THP und Phalloidin gefärbt und ein nächster Schnitt auf AQP2 und Calbindin, was ermöglichte eine Zyste mit > 7 µm Durchmesser auf alle vier Färbungen hin zu beurteilen.

Hierbei wurden bei insgesamt 20 Nieren (von 20 verschiedenen Tieren) insgesamt 170 Zysten beobachtet, welche sowohl auf den THP/Phalloidin-Schnitten, als auch auf den AQP2/Calbindin-Schnitten zu finden waren.

Es bestätigte sich das Ergebnis der Färbung der Paraffin-Schnitte, wieder waren alle beobachteten Zysten AQP2-positiv. Eine Calbindin-Färbung konnte nicht beobachtet werden und auch kein mit Phalloidin markierter Bürstensaum. Auch in den nicht-zystischen Tubulusabschnitten proximal oder distal der Zysten war kein Bürstensaum zu sehen. Es zeigte sich bei einigen Zysten, dass deren Lumen mit einem stark THP-positiven Material gefüllt war, was zunächst die Beurteilung erschwerte, ob das Epithel selbst auch THP-positiv war. In stärkerer Vergrößerung aber, und im Vergleich mit den AQP2-gefärbten korrespondierenden Serienschritten, zeigte sich, dass das Epithel selbst AQP2-positiv war und das THP-positive Material dem Epithel nur aufgelagert war. Bei einigen Zysten war außerdem zu sehen, dass diese in einen AQP2-positiven Tubulusabschnitt übergingen, eine Fortsetzung in einen THP-positiven Abschnitt konnte nicht beobachtet werden. (siehe Abbildung 3.18 E und F)

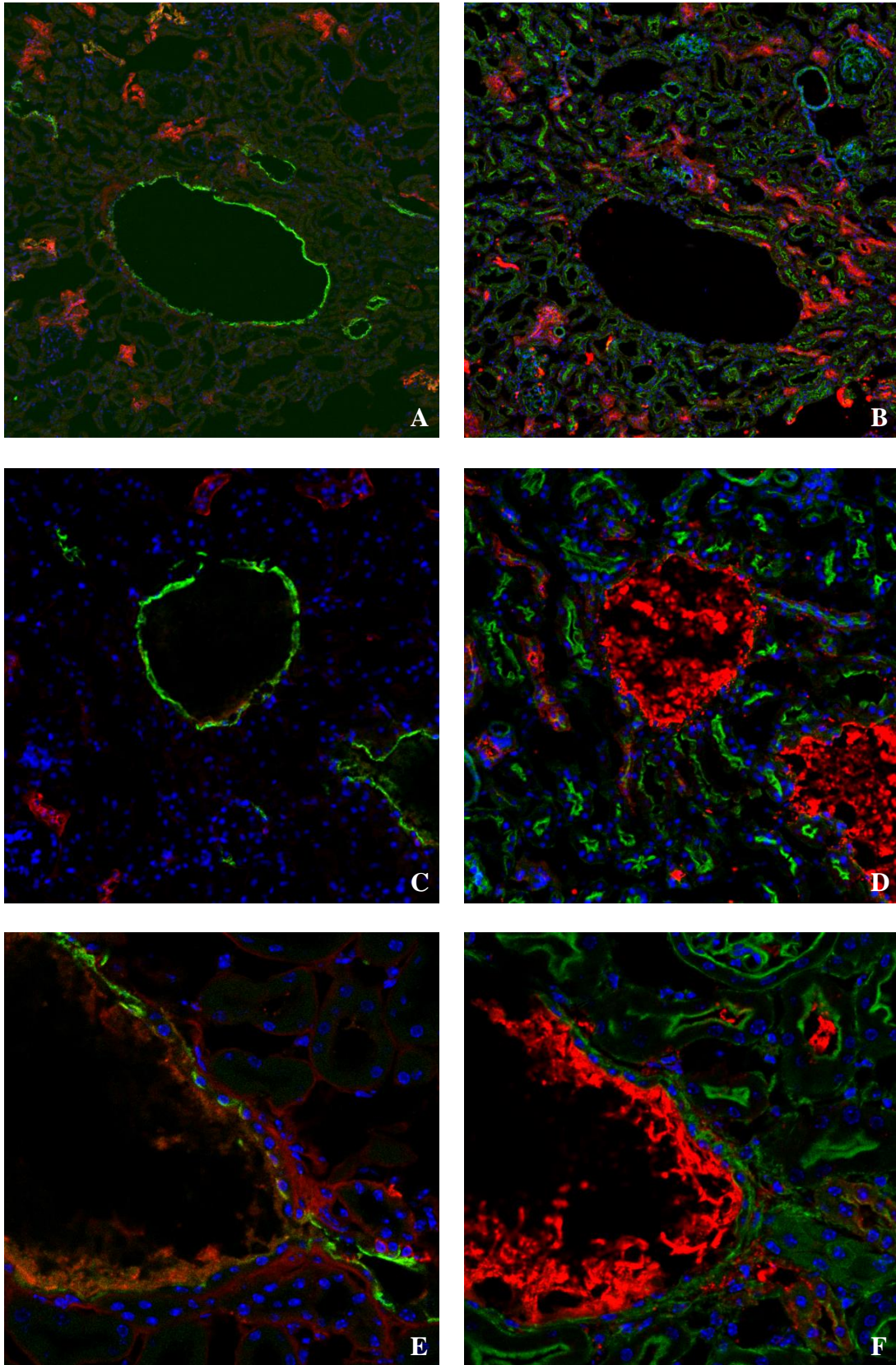


Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten von 129/Sv-p/p-Nieren, **A:** 100-fache Vergrößerung, grün: AQP2, rot: Calbindin, **B:** 100-fache Vergrößerung, grün: Phalloidin, rot: THP, **C:** 200-fache Vergrößerung, grün: AQP2, rot: Calbindin, **D:** 200-fache Vergrößerung, grün: Phalloidin, rot: THP, **E:** 400-fache Vergrößerung, grün: AQP2, rot: Calbindin, **F:** 400-fache Vergrößerung, grün: Phalloidin, rot: THP

Des Weiteren wurde noch eine DAB-Färbung auf AQP2 durchgeführt und die Schnitte anschließend einer HE-Färbung unterzogen. Verwendet wurden dabei Schnitte von Mausnieren mit 129/Sv-Hintergrund mit dem p/p-Genotyp, welche in Paraffin eingebettet waren. Für die Bilder ganzer Nieren, welche mit dieser Methode gefärbt wurden, siehe Anhang 6.2. Hier dargestellt ist eine exemplarische Zyste, welche ebenfalls AQP2-positiv ist.

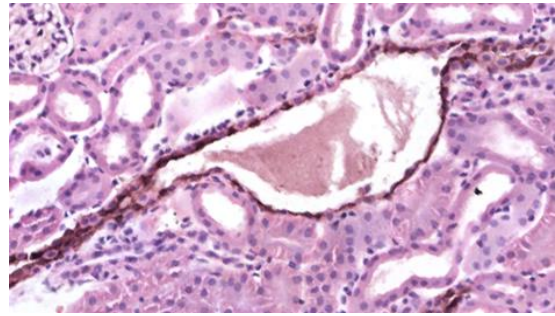


Abbildung 3.19: DAB-Färbung mit HE-Färbung, braun: AQP2

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zysten der homozygoten Knock-In-Mäuse auf 129/Sv-Hintergrund, soweit beobachtet, alle positiv auf den Sammelrohrmarker AQP2 waren und keine Anfärbbarkeit auf einen anderen verwendeten Tubulusabschnittsmarker aufwiesen.

3.4.3. Bestimmung des Tubulusdurchmessers

Wie bereits beschrieben, wirkten vor allem in der Papille die Sammelrohre bei den homozygoten Knock-In-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund 129/Sv weiter als bei den Wildtyp-Mäusen. Von daher sollte die Frage geklärt werden, ob der Durchmesser der Nierentubuli in den Knock-In-Mäusen von denen der Wildtyp-Mäuse statistisch signifikant abweicht. Hierzu wurden in Paraffin eingebettete Nieren mit einem Tubulussegmentmarker und einem Antikörper gegen Laminin (L-9393, 1:100) gefärbt. Mittels des Segmentmarkers wurden dabei die auszuwertenden Tubulusanschnitte identifiziert und die Fläche des Lumens bestimmt, die Lamininfärbung, welche die Basalmembran und somit die Außengrenzen der Tubuli anfärbt⁽⁹⁸⁾, wurde zur Bestimmung der Rundheit des Anschnittes herangezogen, da diese Einfluss auf die Größe des angeschnittenen Lumens hat. Tubuli, die schräger angeschnitten und somit eher oval sind, haben eine größere Fläche als Tubuli, die annähernd senkrecht angeschnitten und daher runder sind.

Da die Auswertung mit ImageJ erfolgte und es hier zwei Kriterien zur Bestimmung der Rundheit gibt (Roundness und Circularity), wurden zuerst Überlegungen angestellt, welches der beiden Kriterien aussagekräftiger ist.

Zugrunde gelegt wurde ein Modell, mit der Prämisse, dass ein Tubulus ein gerades Rohr ist und einen kreisförmigen Querschnitt hat. Um die Fläche des Querschnitts bestimmen zu können, müsste man genau senkrecht zum Verlauf des Tubulus schneiden und würde so den Durchmesser X erhalten mit der Kreisfläche $(\frac{X}{2})^2 \pi$. Bei einem Schnitt durch eine Niere werden

aber nur die wenigsten Tubuli genau senkrecht getroffen, die meisten sind davon um einen Korrekturwinkel α abweichend angeschnitten. Dadurch verformt sich der Kreis zu einer Ellipse, deren kurze Achse immer noch X ist und deren lange Achse Y durch den Korrekturwinkel α definiert wird. Zeichnet man sich dieses Szenario schematisch auf, so erkennt man, dass ein rechtwinkliges Dreieck vorliegt, mit der Hypotenuse Y und der Ankathete zu Winkel α X. (Vergleiche Abbildung 3.20)

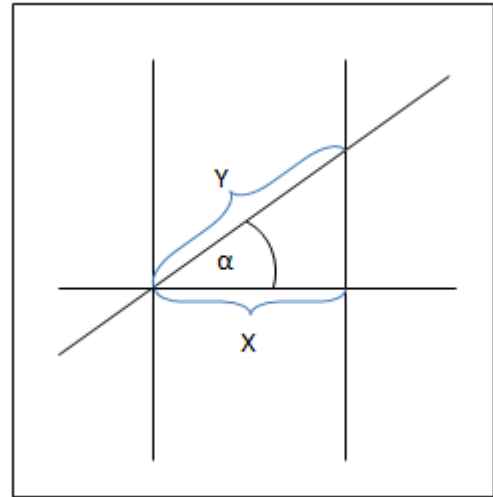


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des zugrunde gelegten Modells

Folglich gilt: $\cos \alpha = \frac{X}{Y}$ bzw. $X = \cos \alpha \times Y$

Als nächstes betrachtet man, wie bei ImageJ Circularity und Roundness definiert sind. Es gilt:

$$\text{Circularity} = 4\pi \frac{\text{Fläche}}{(\text{Umfang})^2}$$

$$\text{Roundness} = 4 \frac{\text{Fläche}}{\pi \times (\text{Lange Halbachse}^2)}$$

wobei beide Größen einen Wert zwischen 0 und 1 (ein perfekter Kreis) annehmen können ^(99, 100). Als Fläche liegt in der Idealvorstellung eine Ellipse vor (wobei ein Kreis auch eine Ellipse darstellt, bei der lange und kurze Halbachse identisch sind), deren Fläche wie folgt berechnet wird: Fläche = $\pi \times a \times b$; mit a = lange Halbachse und b = kurze Halbachse.

Im vorliegenden Modell entspricht die lange Halbachse der Hälfte der Strecke Y, folglich gilt $a = \frac{Y}{2}$, und die kurze Halbachse der Hälfte der Strecke X, also $b = \frac{X}{2}$.

Daher lässt sich die Ellipsenfläche schreiben als: Fläche = $\pi \times a \times b = \pi \frac{YX}{4} = \pi \frac{Y^2 \times \cos \alpha}{4}$ (da gilt $X = Y \times \cos \alpha$)

Der Umfang einer Ellipse lässt sich exakt nur mittels Reihenentwicklung oder Integral berechnen, die Näherungsformel nach Ramanujan ist mit einem relativen Fehler von $< 0,1 \%$ jedoch ebenfalls sehr genau und wird daher zur Vereinfachung herangezogen. Nach Ramanujan gilt⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾:

$$\text{Umfang} = \pi(a+b) \left(1 + \frac{3\lambda^2}{10 + \sqrt{4 - 3\lambda^2}} \right) \text{ mit } \lambda = \frac{a-b}{a+b}$$

Unter Berücksichtigung, dass gilt $a = \frac{Y}{2}$; $b = \frac{X}{2}$ und $X = Y \times \cos \alpha$ kann die Formel geschrieben werden als:

$$\text{Umfang} = \pi \left(\frac{Y + (Y \times \cos \alpha)}{2} \right) \left(1 + \frac{3 \times \lambda^2}{10 + \sqrt{(4 - 3 \times \lambda^2)}} \right) \text{ mit } \lambda = \frac{\frac{Y - (Y \times \cos \alpha)}{2}}{\frac{Y + (Y \times \cos \alpha)}{2}} = \frac{Y - (Y \times \cos \alpha)}{Y + (Y \times \cos \alpha)}$$

Die Formel für den Umfang wird im Folgenden durch „U“ abgekürzt.

Die Formeln für Circularity und Roundness lassen sich daher darstellen als:

$$\text{Circularity} = 4\pi \frac{\pi \frac{Y^2 \times \cos \alpha}{4}}{U^2} = \pi^2 \left(\frac{Y^2 \times \cos \alpha}{U^2} \right)$$

$$\text{Roundness} = 4 \frac{\pi \frac{Y^2 \times \cos \alpha}{4}}{\pi \times Y^2} = \frac{\pi \times Y^2 \times \cos \alpha}{\pi \times Y^2} = \cos \alpha$$

Diese beiden Formeln wurden in Abhängigkeit vom Anschnittwinkel α mittels WxMaxima geplottet, das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

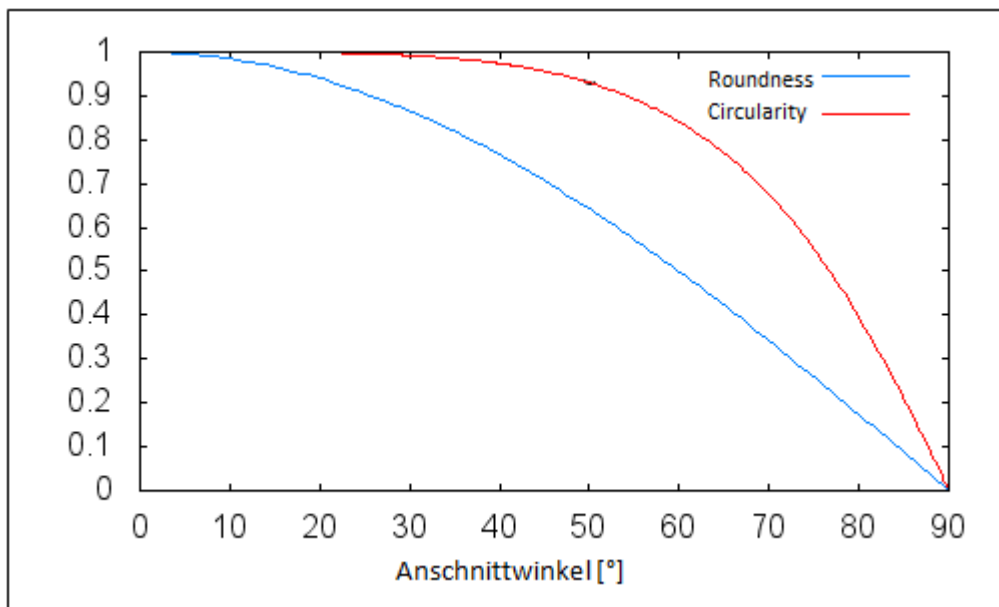


Abbildung 3.21: Werte der Parameter Roundness und Circularity in Abhängigkeit vom Anschnittwinkel

Man kann erkennen, dass der Parameter Roundness bei steigendem Anschnittwinkel schneller abfällt, als der Parameter Circularity. Somit ist Roundness bei Verwendung dieses Modells der sensiblere und validere Parameter zur Bestimmung der Rundheit eines Tubulusabschnittes.

Daher wurde der Parameter Roundness zur Bestimmung der Rundheit herangezogen, wobei ein Wert von 0,8 als Cut-off festgelegt wurde, was einem Anschnittwinkel von ca. 36°

entspricht. Allerdings ist dabei nicht eingerechnet, dass die Tubuli keinen perfekten Kreis darstellen, sondern beispielsweise durch Zellkerne ausgebeult oder durch umgebende Strukturen eingedrückt werden, wodurch der Anschnittwinkel bei 0,8 Roundness einiges unter 36° liegen sollte. Der Wert 0,8 stellte einen Kompromiss dar zwischen der Genauigkeit der Flächenbestimmung, welche bei hoher Rundheit am besten ist, und dem Bedarf an möglichst vielen Messergebnissen, um der Statistik die nötige Aussagekraft verleihen zu können.

Als erstes wurden Nieren von 129/Sv-Mäuse (+/+ und p/p, alle 3 Monate alt) mit dem Sammelrohrmarker AQP2 (Antikörper SC-9882, 1:200) gefärbt und ausgewertet. Insgesamt wurden dabei 252 Sammelrohranschnitte mit einer Rundheit von $\geq 0,8$ bei den Wildtyp-Mäusen (bei 4 Tieren) gefunden und 274 bei den Knock-In-Mäusen (bei 6 Tieren).

Zuerst wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt (siehe Tabelle 3.2 und Anhang) und die Daten als Histogramm und Boxplot dargestellt (siehe Abbildung 3.22 und Anhang). Hier fiel bereits auf, dass die Flächeninhalte bei den Knock-In-Mäusen über einen größeren Bereich verteilt waren und tendenziell größere Werte aufwiesen (Mittelwert 202 μm^2 bei +/+ vs. 577 μm^2 bei p/p, Median 189 μm^2 vs. 445 μm^2 , Interquartilbereich 160 μm^2 vs. 447 μm^2).

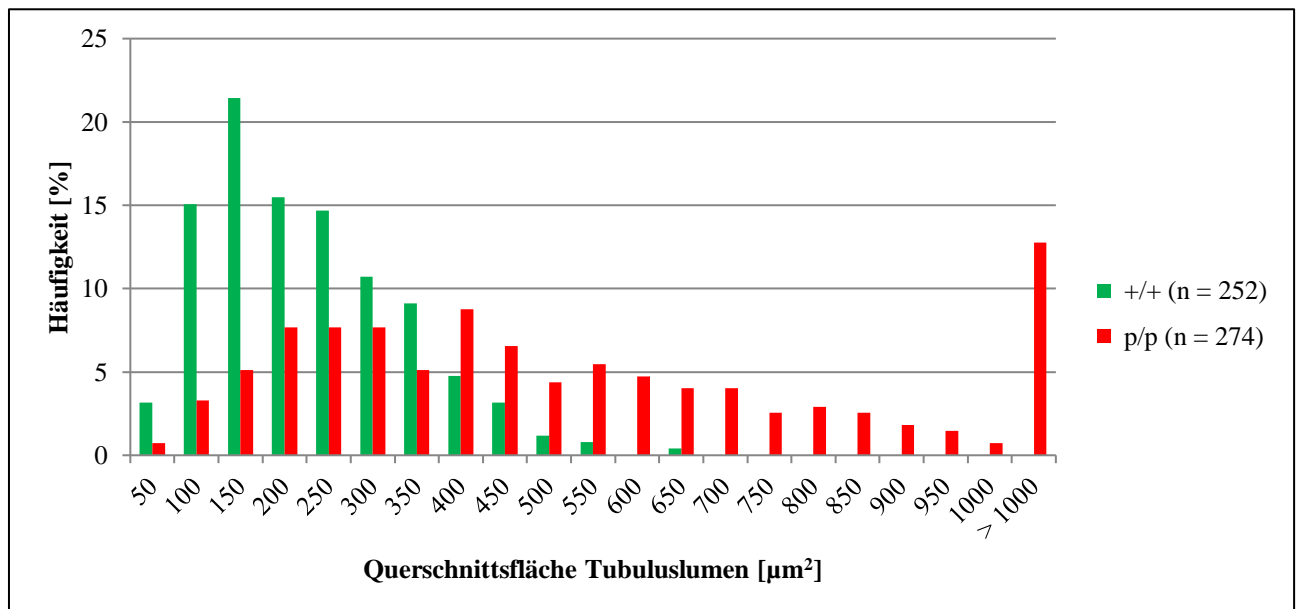


Abbildung 3.22: Histogramm der Querschnittsflächen der Sammelrohrlumina, genetischer Hintergrund: 129/Sv

	Mittelwert [μm^2]	Standardabweichung [μm^2]	Median [μm^2]	25-%-Quantil [μm^2]	75-%-Quantil [μm^2]
+/+	202,41	108,40	189,67	117,41	277,69
p/p	577,19	521,79	444,54	252,02	698,83

Tabelle 3.2: Statistische Kenngrößen der Querschnittsflächen der Sammelrohrlumina, genetischer Hintergrund: 129/Sv

Um zu testen, ob der Unterschied der Mittelwerte und der Mediane signifikant ist, wurde zuerst überprüft, ob die Daten in einer Normalverteilung oder einer schiefen Verteilung vorlagen. Der bereits (im Anhang) gezeigte Boxplot und die Histogramme legen eine schiefe Verteilung nahe und die durchgeführten Tests auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk) lehnen die Nullhypothese „Die Daten sind normalverteilt“ ab ($p < 0,001$). Daher wird für die Testung der Nullhypothese „Die Verteilung der Flächeninhalte unterscheiden sich bei +/+ und p/p nicht“ der Wilcoxon-Rangsummentest (= Mann-Whitney-U-Test) verwendet, welcher hoch signifikant ausfiel ($p < 0,001$). Somit darf angenommen werden, dass die Flächeninhalte der Sammelrohre bei den homozygoten Knock-In-Mäusen signifikant größer sind als bei den Wildtyp-Mäusen.

Tests auf Normalverteilung

Genotyp	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Fläche [μm^2] +/+	,089	252	,000	,950	252	,000
p/p	,165	274	,000	,740	274	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 3.3: Tests auf Normalverteilung für die Werte der Sammelrohre auf 129/Sv-Hintergrund

Hypothesentestübersicht

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von Fläche [μm^2] ist über die Kategorien von Genotyp identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen

Asymptotische Signifikanz werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

Tabelle 3.4: Ergebnis des Rangsummentests zum Vergleich der Sammelrohre auf 129/Sv-Hintergrund

Als letztes wurde noch überprüft, ob der Parameter Roundness bei beiden Genotypen annähernd gleich verteilt war, da es bei einer ungleichen Verteilung zu einer Ergebnisverfälschung kommen könnte, bedingt durch die Tatsache, dass Anschnitte mit geringerer Roundness tendenziell mehr Fläche aufweisen als Anschnitte mit hoher Roundness (da bei niedriger Roundness der Anschnittwinkel größer wird, siehe oben). Der Boxplot zeigte jedoch für beide Genotypen eine annähernd gleiche Verteilung, u.U. ist die Roundness bei den Knock-In-Mäusen sogar etwas größer (Mittelwert = 0,863 beim Genotyp +/+ vs. 0,869

beim Genotyp p/p), so dass hier keine Fehlerquelle für den signifikanten Unterschied zu finden war.

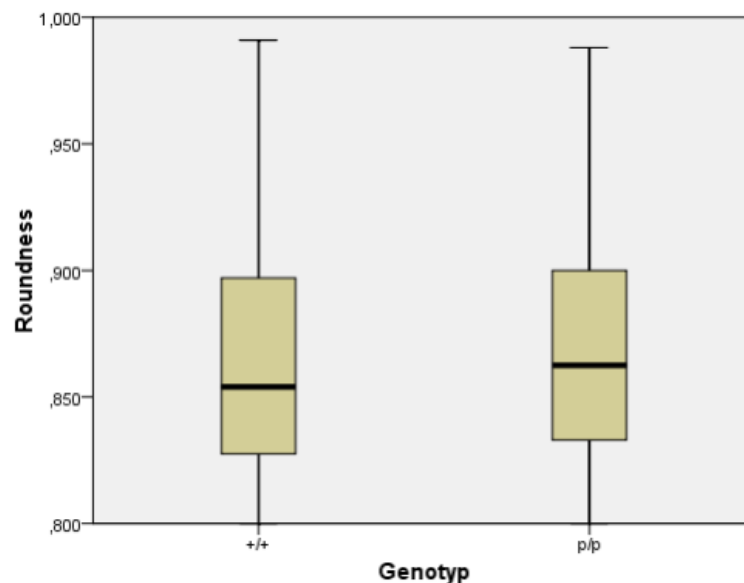


Abbildung 3.25: Boxplot des Parameters Roundness der ausgewerteten Sammelrohranschnitte; 129/Sv-Hintergrund, Genotypen +/+ und p/p

Als nächstes wurde getestet, ob sich auch die distalen Tubuli in der Pars convoluta bei den 129/Sv-Mäusen signifikant unterschieden, da hier ebenfalls ein Hauptexpressionsort von *Pkd2* ist⁽⁷⁵⁾. Hierzu wurden Nieren-Schnitte von 6 +/+ -Mäusen und 6 p/p -Mäusen (alle 3 Monate alt) auf NCC (Anti-NCC 1:1.000) und Laminin gefärbt und ebenfalls ausgewertet. Bei deskriptiver Statistik (siehe Anhang) und Histogramm (siehe Abbildung 3.26) zeigte sich wieder, dass die Flächeninhalte des Lumens für die homozygoten Knock-In-Mäuse über einen größeren Bereich verteilt waren. Auch der Mittelwert und der Median waren größer als bei den Wildtyp-Mäusen (Mittelwert = 89,97 μm^2 bei +/+ vs. 113,92 μm^2 bei p/p; Median = 65,51 μm^2 bei +/+ vs. 68,59 μm^2 bei p/p), der Unterschied war allerdings sowohl relativ als auch absolut geringer als bei den Sammelrohren.

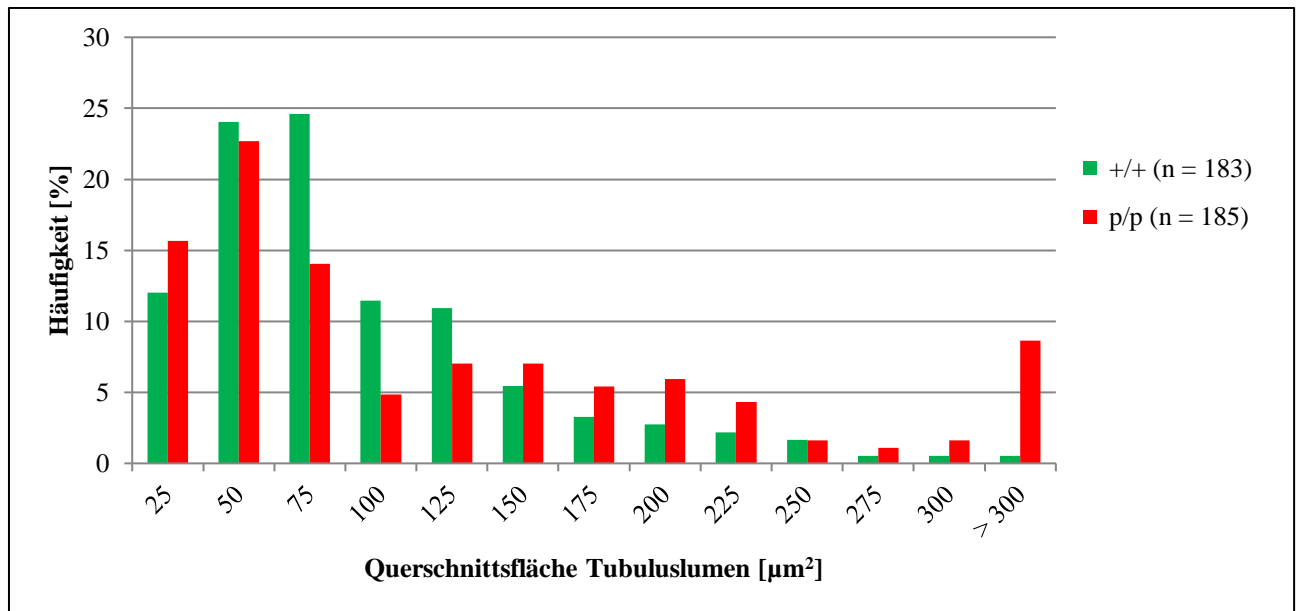


Abbildung 3.26: Histogramm der Querschnittsflächen der Lumina des distalen Tubulus, Pars recta, genetischer Hintergrund: 129/Sv

	Mittelwert [µm²]	Standardabweichung [µm²]	Median [µm²]	25-%-Quantil [µm²]	75-%-Quantil [µm²]
+/+	89,97	166,50	65,51	35,39	107,01
p/p	113,92	107,97	68,59	34,20	164,92

Tabelle 3.5: Statistische Kenngrößen der Querschnittsflächen der Lumina des distalen Tubulus, Pars recta, genetischer Hintergrund: 129/Sv

Auch hier wiesen die Histogramme und Boxplots (siehe Anhang) Zeichen einer schiefen Verteilung auf und die Tests auf Normalverteilung bestätigten dies. Daher wurde erneut ein Rangsummentest durchgeführt, um zu testen, ob der Unterschied zwischen Knock-In-Mäusen und Wildtyp-Mäusen signifikant ist. Der Rangsummentest fiel diesmal nicht signifikant aus ($p = 0,089$).

Tests auf Normalverteilung						
Genotyp	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Fläche [µm²] +/+	,302	183	,000	,261	183	,000
p/p	,175	185	,000	,834	185	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 3.6: Tests auf Normalverteilung für die Werte der distalen Tubuli, Pars recta, auf 129/Sv-Hintergrund

Hypothesentestübersicht

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von Fläche [μm^2] ist über die Kategorien von Genotyp identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,089	Nullhypothese beibehalten

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

Tabelle 3.7: Ergebnis des Rangsummentests zum Vergleich der distalen Tubuli, Pars recta, auf 129/Sv-Hintergrund

Beim Vergleich der korrespondierenden Werte des Parameters Roundness zeigten sich auch bei diesem Versuch keine gravierenden Unterschiede, die Fehlerquellen für den Vergleich der Querschnittsflächen darstellen könnten (Mittelwert = 0,880 bei +/+ und 0,883 bei p/p).

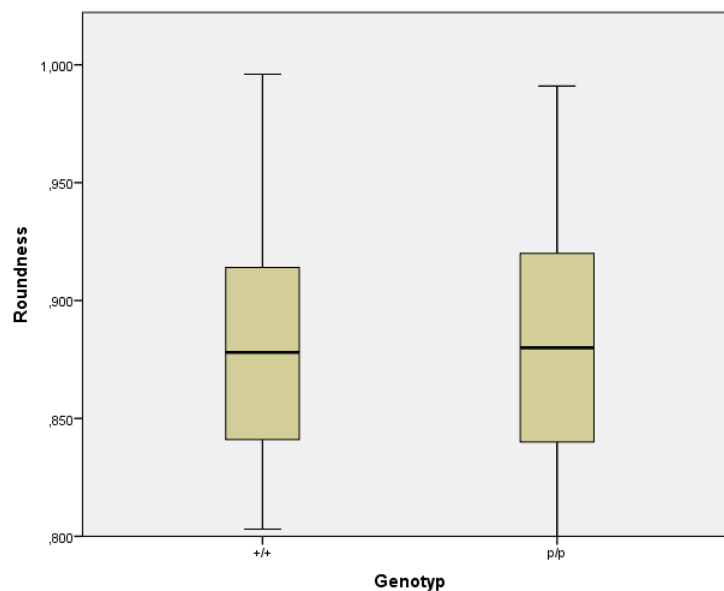


Abbildung 3.27: Boxplot des Parameters Roundness der ausgewerteten Anschnitte der distalen Tubuli; 129/Sv-Hintergrund, Genotypen +/+ und p/p

Abschließend wurde überprüft, ob es auch bei den Sammelrohren der C57Bl/6-Mäuse signifikante Unterschiede bei den Flächen der Lumina gibt. Hierzu wurden von 6 +/+-Mäusen und 6 p/p-Mäusen (alle 3 Monate alt) je ein Nierenschnitt auf AQP2 und Laminin gefärbt.

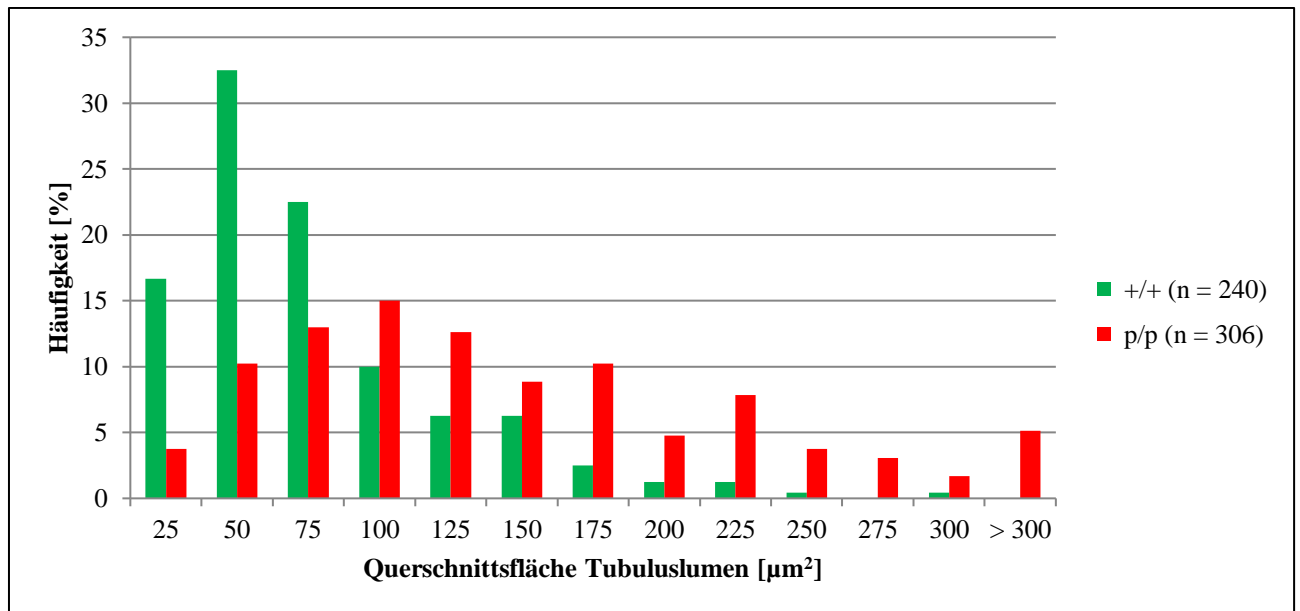


Abbildung 3.28: Histogramm der Querschnittsflächen der Sammelrohrlumina, genetischer Hintergrund: C57Bl/6

	Mittelwert [µm²]	Standardabweichung [µm²]	Median [µm²]	25-%-Quantil [µm²]	75-%-Quantil [µm²]
+/+	64,07	46,30	50,84	30,16	81,99
p/p	136,56	88,84	116,95	74,34	180,98

Tabelle 3.8: Statistische Kenngrößen der Querschnittsflächen der Sammelrohrlumina, genetischer Hintergrund: C57Bl/6

Die Auswertung (siehe Abbildung 3.28, Tabelle 3.8. und Anhang) zeigte erneut eine größere Spannweite der Flächeninhalte für die p/p-Mäuse. Auch hier waren Mittelwert und Median größer als bei den Wildtyp-Mäusen (Mittelwert = 64,07 µm² bei +/+ vs. 136,56 µm² bei p/p; Median = 50,84 µm² bei +/+ und 116,95 µm² bei p/p). Es fällt aber auf, dass die Werte generell kleiner sind als bei den Sammelrohren der 129/Sv-Mäuse. Ein durchgeführter Rangsummentest (nach Durchführung eines Tests auf Normalverteilung) zeigt, dass hier ein signifikanter Unterschied vorliegt.

Tests auf Normalverteilung						
Genotyp	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Fläche [µm²] +/+	,140	243	,000	,858	243	,000
p/p	,092	316	,000	,888	316	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 3.9: Tests auf Normalverteilung für die Werte der Sammelrohre auf C57Bl/6-Hintergrund

Hypothesentestübersicht

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von Fläche [μm^2] ist über die Kategorien von Genotyp identisch.	Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

Tabelle 3.10: Ergebnis des Rangsummentests zum Vergleich der Sammelrohre auf C57Bl/6-Hintergrund

Der Vergleich des Parameters Roundness zeigte erneut große Übereinstimmungen bei der Verteilung zwischen den Genotypen (Mittelwert = 0,871 beim +/+ - Genotyp und auch beim p/p - Genotyp), was für die Signifikanz des Ergebnisses spricht.

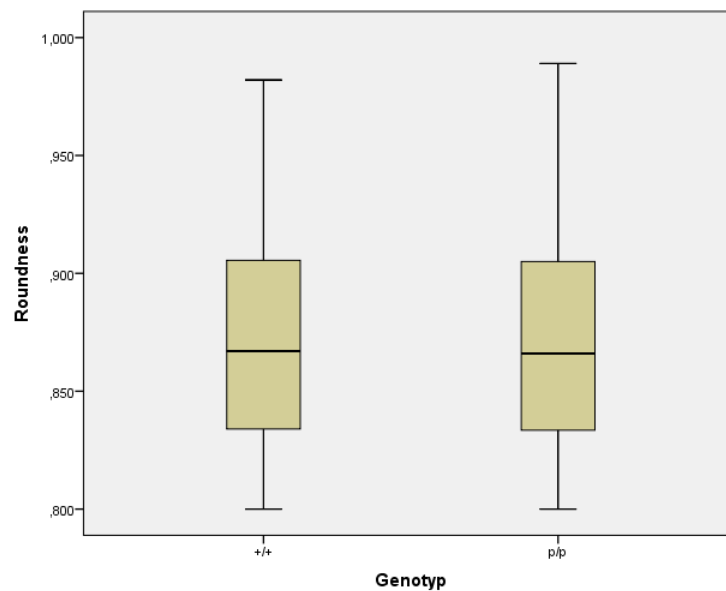


Abbildung 3.29: Boxplot des Parameters Roundness der ausgewerteten Sammelrohranschnitte, C57Bl/6-Hintergrund, Genotypen +/+ und p/p.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass bei den 129/Sv-Mäusen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Größe der Sammelrohre zwischen den Genotypen +/+ und p/p bestand, der sich aber nicht auf die distalen Tubuli übertragen ließ. Auch bei der Mauslinie C57Bl/6 waren die Sammelrohre bei den p/p-Mäusen signifikant größer als bei den +/- Mäusen.

3.5. Untersuchung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit mittels GCaMP-Messungen

3.5.1. Prinzip

Ziel der GCaMP-Messungen war es, die Ca^{2+} -Leitfähigkeit zwischen Wildtyp-Polycystin-2 und mutiertem Polycystin-2 vergleichen zu können.

Hierfür wurden Plasmide mit der Information für ein GCaMP-Polycystin-2-Fusionsprotein und DsRed in LLC-PK₁-Zellen transfiziert, welche dann mit Ca^{2+} -freisetzenden Substanzen (Vasopressin und ATP)⁽¹⁰⁴⁻¹¹⁰⁾ stimuliert wurden, was zu einem Fluoreszenzanstieg des GCaMP-Proteins führte, welcher mit der Ca^{2+} -Konzentration korrelierte.

GCaMP ist ein Fusionsprotein, bestehend aus einem cpEGFP (circularly permuted enhanced green fluorescent protein), welches am N-Terminus mit dem M13-Fragment der Myosin-Leichtketten-Kinase und am C-Terminus mit Calmodulin verbunden ist^(111, 112). M13 und Calmodulin interagieren zusätzlich miteinander^(111, 112). In Anwesenheit von Ca^{2+} , welches durch Calmodulin gebunden wird, kommt es zu Konformationsänderungen, welche zu einer verstärkten Fluoreszenz führen^(113, 114). Seit seiner Entdeckung wurde GCaMP mehrfach modifiziert^(111, 113, 115-117), bei dem hier verwendeten Protein handelte es sich um GCaMP6s, welches sich im Vergleich zu den anderen Proteinen seiner Generation (GCaMP6f und GCaMP6m) durch die höchste Sensitivität auszeichnet^(113, 116).

GCaMP gehört zu den GECI's (Genetically Encoded Ca^{2+} -Indicators), die den Vorteil besitzen, in spezifischen subzellulären Kompartimenten die Ca^{2+} -Konzentration bestimmen zu können⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. Durch die Klonierung eines Fusionsproteins aus Polycystin-2 und GCaMP6s konnte so die Ca^{2+} -Änderungen in direkter Umgebung der zytoplasmatischen Seite von Polycystin-2 beurteilt werden.

Durch das zusätzlich auf dem Plasmid enthaltene DsRed (= drFP583), einem rot fluoreszierenden Protein, konnte vor der Messung eine Stelle mit möglichst vielen transfizierten Zellen für den Aufnahmebereich gewählt werden⁽¹²¹⁻¹²³⁾. Bedingt durch den weiten Abstand der Emissionsmaxima von DsRed (583nm) und GCaMP6s (509nm) war ein Überschlagen von einem Signal in den anderen Aufnahmekanal und somit eine Verfälschung der Messwerte allenfalls nur geringfügig zu erwarten⁽¹²³⁾.

Nach der Stimulation mit ATP bzw. Vasopressin, welche eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum initiierte, wurde die Fluoreszenz der Zellen bei 493-539 nm für 10 min aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

3.5.2. Ergebnis der Klonierung der GCaMP-Konstrukte

Um mittels CCaMP-Messungen die Leitfähigkeit von Polycystin-2(hPoreL1) mit dem Wildtyp-Protein vergleichen zu können, war es zunächst nötig, die Klonierung der benötigten Konstrukte abzuschließen.

Ziel war es, sämtliche Konstrukte vom pcDNA3-Vektor in den pIRES2-DsRed-Express-Vektor zu überführen, um dann während der GCaMP-Messungen anhand der roten Fluoreszenz des DsRed-Express-Proteins eindeutig feststellen zu können, welche Zellen transfiziert waren. Für den Ablauf der Klonierung und die Klonierungsstrategie siehe 2.2.13., hier wird das Ergebnis der Überprüfung der Klonierung nach der Transformation in Bakterien beschrieben.

Nach Transformation der fertigen Konstrukte wurde bei erfolgreichem Anwachsen von Bakterienkolonien auf LB-Medium-Platten mit Kanamycin eine Midi-Plasmidextraktion durchgeführt und die erhaltenen Plasmide mit NheI-HF verdaut.

Die erwarteten Banden waren dabei:

Für pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s und pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s: 7879bp + 1764bp

Für pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA und pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA: 7030bp + 2535bp

Der NheI-HF-Verdau für alle vier benötigten Konstrukte ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Man sieht für alle Konstrukte Banden, die der erwarteten Höhe entsprechen.

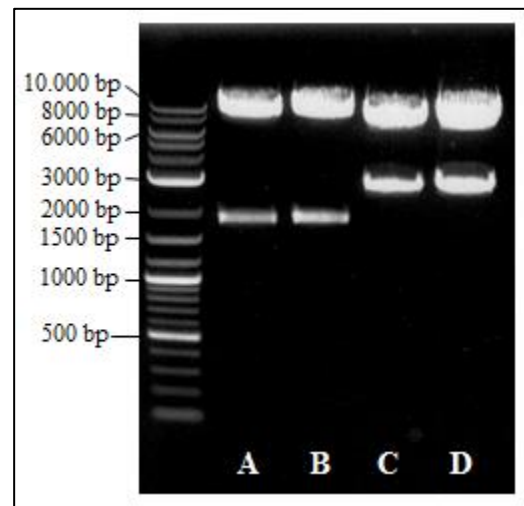


Abbildung 3.30: Resultat des NheI-Verdau der GCaMP6s-Konstrukte. **A:** pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s. **B:** pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s. **C:** pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA **D:** pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA

Anschließend wurden die Plasmide sequenziert, wobei bei keinem der Konstrukte ein Fehler in der Sequenz festgestellt werden konnte.

Nachfolgend wurden die Konstrukte in LLC-PK₁-Zellen transfiziert und eine Proteinisolation durchgeführt. Das erhaltene Lysat wurde mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Neben den vier Konstrukten wurde auch ein Lysat von PKD2-Knockout-Zellen als Negativkontrolle und Lysate von Zellen mit den Konstrukten pcDNA3/PKD2, HA und

pcDNA3/PKD2 (hPoreL1), HA als Positivkontrolle aufgetragen. Der Western Blot wurde mittels anti-hPKD2-C Antikörper (1:5000) und anti-Aktin (als Ladekontrolle, Konzentration 1:2500) gefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.31 dargestellt.

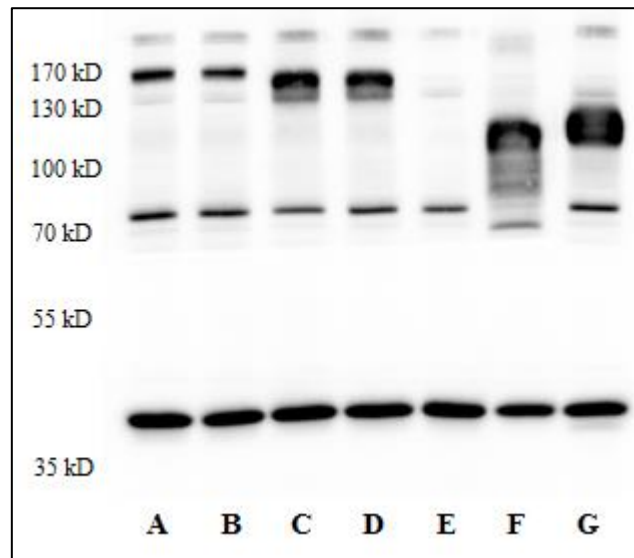


Abbildung 3.31: Western Blot von Lysaten aus LLC-PK₁-Zellen, gefärbt mit anti-hPKD2-C und anti-Aktin. **A:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s. **B:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s. **C:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA. **D:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA. **E:** PKD2-Knock-out-Zellen. **F:** Transfiziert mit pcDNA3/PKD2, HA **G:** Transfiziert mit pcDNA3/PKD2 (hPoreL1), HA

Man sieht eine starke Bande bei den beiden Positivkontrollen in Höhe von 110 kD, welche Polycystin-2 entsprach. Diese Bande fehlte erwartungsgemäß bei den Proteinen der vier Konstrukte, dafür waren hier Banden in Höhe von ca. 170 kD vorhanden, was der erwarteten Größe der Fusionsproteine entsprach. Es fiel allerdings auf, dass pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s und pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s anscheinend etwas höher liefen als pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA und pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA. In der Negativkontrolle ließ sich keine Polycystin-2-Bande ausmachen. Bei allen aufgetragenen Proben war die Ladekontrolle mit Aktin (42 kD) positiv.

Das Ergebnis legte nahe, dass die Konstrukte erfolgreich in die jeweiligen Fusionsproteine translatiert werden.

Als letztes wurde überprüft, ob die Konstrukte auf die korrekte Weise intrazellulär lokalisieren. Hierzu wurden die Konstrukte in LLC-PK₁-Zellen transfiziert und einer

Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Antikörper 12CA5 (Verdünnung 1:30), welcher das HA-Tag als Zielstruktur hat, unterzogen. Für das Ergebnis siehe Abbildung 3.32.

Nach der Färbung erkannte man bei allen Konstrukten innerhalb der transfizierten Zellen eine retikuläre Zeichnung für das Signal des 12CA5-Antikörpers, passend zum Vorkommen von Polycystin-2 im endoplasmatischen Retikulum. Dieses Signal co-lokalisierte auch mit der grünen Fluoreszenz des GCaMP6s. Dies sprach dafür, dass die Produkte der Konstrukte alle auf die gleiche Weise lokalisieren und die Co-Lokalisation mit dem GCaMP6s-Signal stellte eine Evidenz dafür dar, dass die Fusionsproteine korrekt translatiert werden.

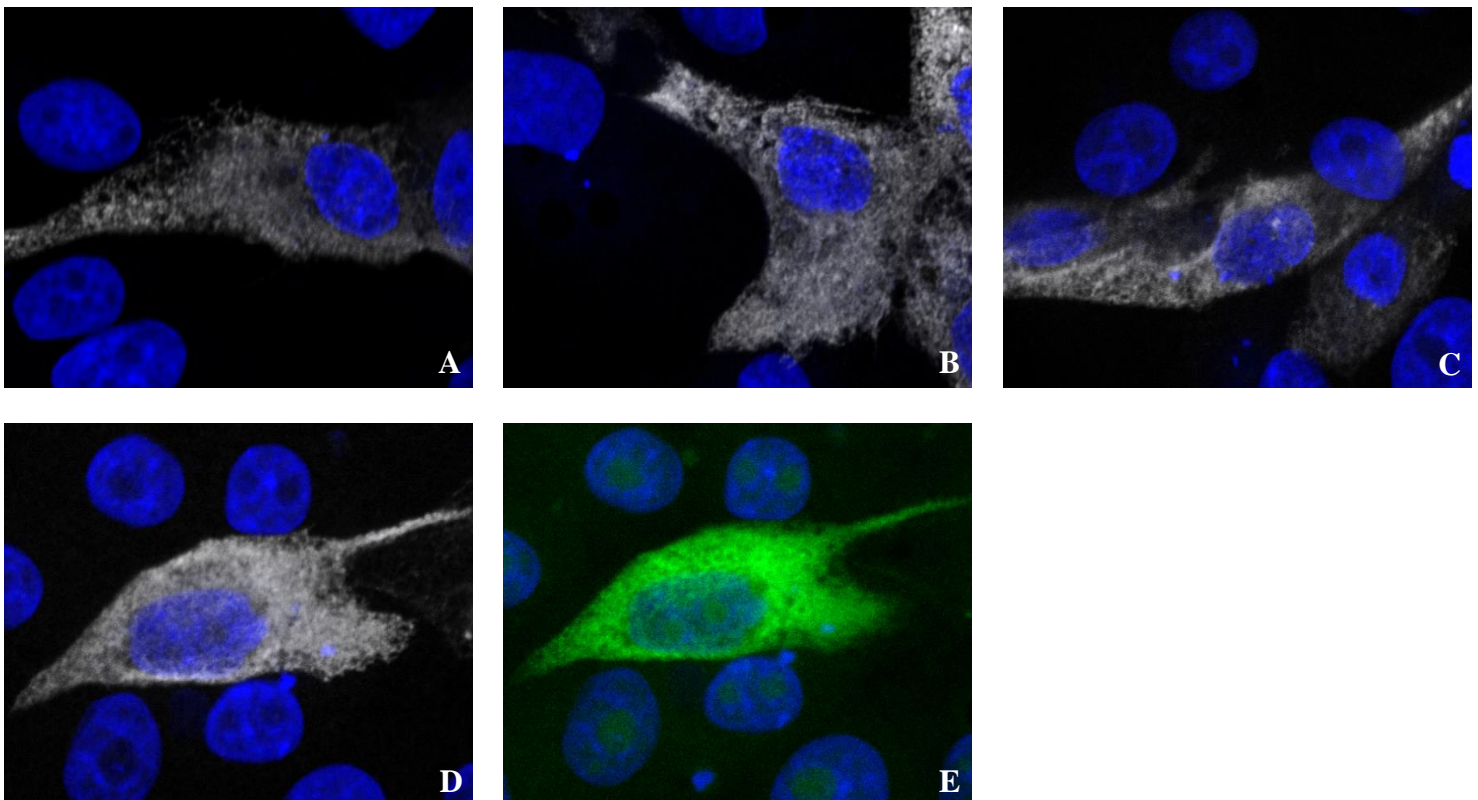


Abbildung 3.32: Transfizierte LLC-PK₁-Zellen, gefärbt mit 12CA5-Antikörper (=HA-Tag), Signal dargestellt in grau, 1260-fache Vergrößerung. **A:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA. **B:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA. **C:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s. **D:** Transfiziert mit pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s. **E:** Grün: Korrespondierendes GFP-Signal des GCaMP6s zu Abbildung 3.X D.

3.5.3. Resultate der GCaMP-Messungen

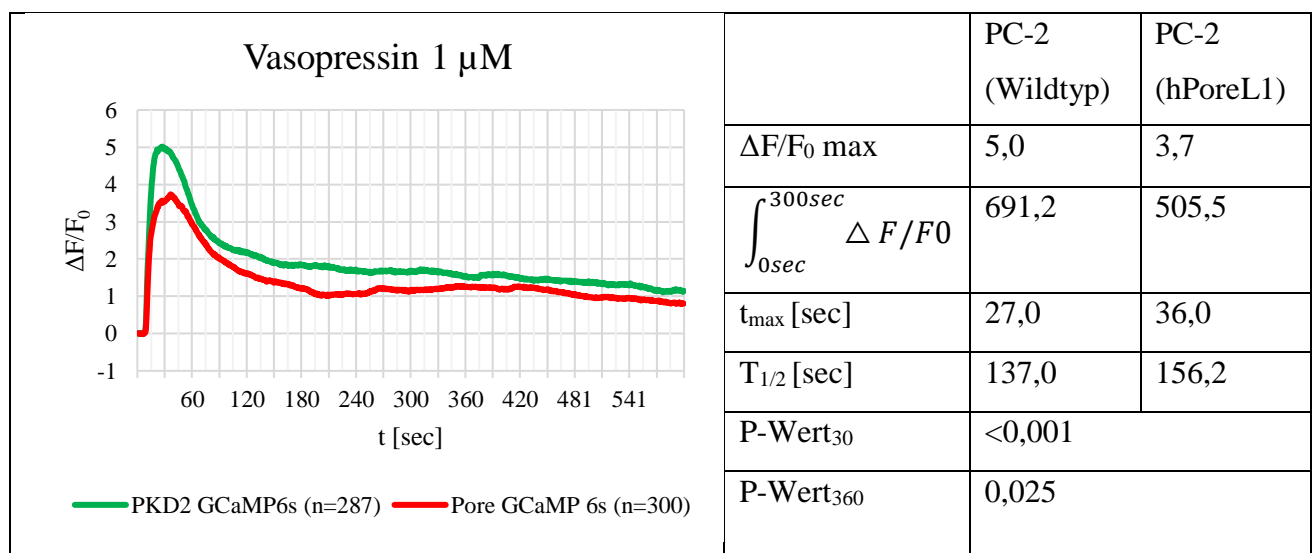
Nach der erfolgreichen Klonierung der Konstrukte wurden diese in LLC-PK₁-Zellen transfiziert und zur Ca²⁺-Messung verwendet. Als Stimulanz für die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung wurden Vasopressin oder ATP, jeweils in den Konzentrationen 1 µM oder 100 nM, verwendet. Die Messung fand entweder in Ca²⁺-haltigem oder Ca²⁺-freiem Puffer statt.

Es gab jeweils drei Messtage pro Versuchsbedingung, welche zunächst einzeln ausgewertet wurden. Waren an jedem Tag die Ergebnisse von der Tendenz kongruent, so wurden sie zusammengefasst.

Im Folgenden zunächst die Ergebnisse für die Konstrukte pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s und pIRES2-DsRed-Express/PKD2 (hPoreL1), HA, GCaMP6s:

In den Graphen ist die relative Fluoreszenz-Änderung ($\Delta F/F_0$) über die Zeit bei 493-539 nm abgebildet. In der korrespondierenden Tabelle sind die maximale relative Fluoreszenz-Änderung ($\Delta F/F_0 \text{ max}$), das Integral der relativen Fluoreszenz-Änderung über die Zeit von 0 sec bis 300 sec ($\int_{0 \text{ sec}}^{300 \text{ sec}} \Delta F/F_0$), die Zeit bis zur maximalen Fluoreszenz-Änderung (t_{max}) und die Halbwertszeit nach Erreichen der maximalen Fluoreszenz ($T_{1/2}$) dargestellt. Des Weiteren wurden die Messwerte bei 30 sec und 360 sec statistisch ausgewertet und zwischen Wildtyp-Polycystin-2 und Polycystin-2(hPoreL1) verglichen. Der erhaltene P-Wert für den Rangsummentest, welcher die Werte von $\Delta F/F_0$ bei 30 bzw. 360 sec verglich (P-Wert₃₀ bzw. P-Wert₃₆₀) ist ebenfalls in der Tabelle dargestellt.

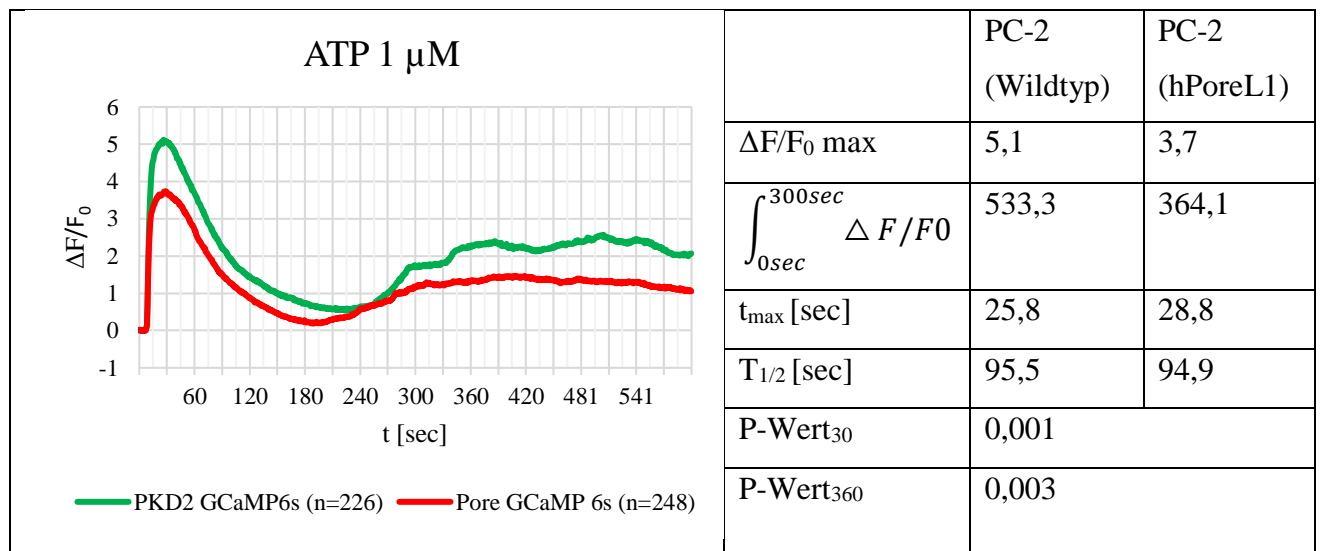
Zunächst wurde Vasopressin in der Konzentration 1 μM genutzt um eine Ca^{2+} -Freisetzung auszulösen, die Zellen befanden sich dabei in Ca^{2+} -haltigem Puffer:



Beide Konstrukte zeigten nach Zugabe von Vasopressin ein identisches Verhalten mit einem zunächst raschen Anstieg der Fluoreszenz, welcher sich dann langsam wieder abbaut. Nach 10 min war die Fluoreszenz jedoch immer noch ca. doppelt so hoch ist wie der Ausgangswert.

Man kann erkennen, dass der Fluoreszenzanstieg beim Wildtyp stärker ausfiel ($\Delta F/F_0 \text{ max} = 5,0$) als beim Konstrukt mit der mutierten Porenregion ($\Delta F/F_0 \text{ max} = 3,7$), der Anstieg bis zum Maximum fand auch schneller statt (27,0 vs. 36,0 sec.) und mit einem p-Wert von $<0,001$ bei 30 sec. war der Unterschied während der Phase des schnellen Anstiegs und des Maximums hoch signifikant. Auch in der Phase der Fluoreszenz-Abnahme lag der Wildtyp kontinuierlich über der Mutante, der Unterschied war hier immer noch signifikant (p-Wert = 0,025).

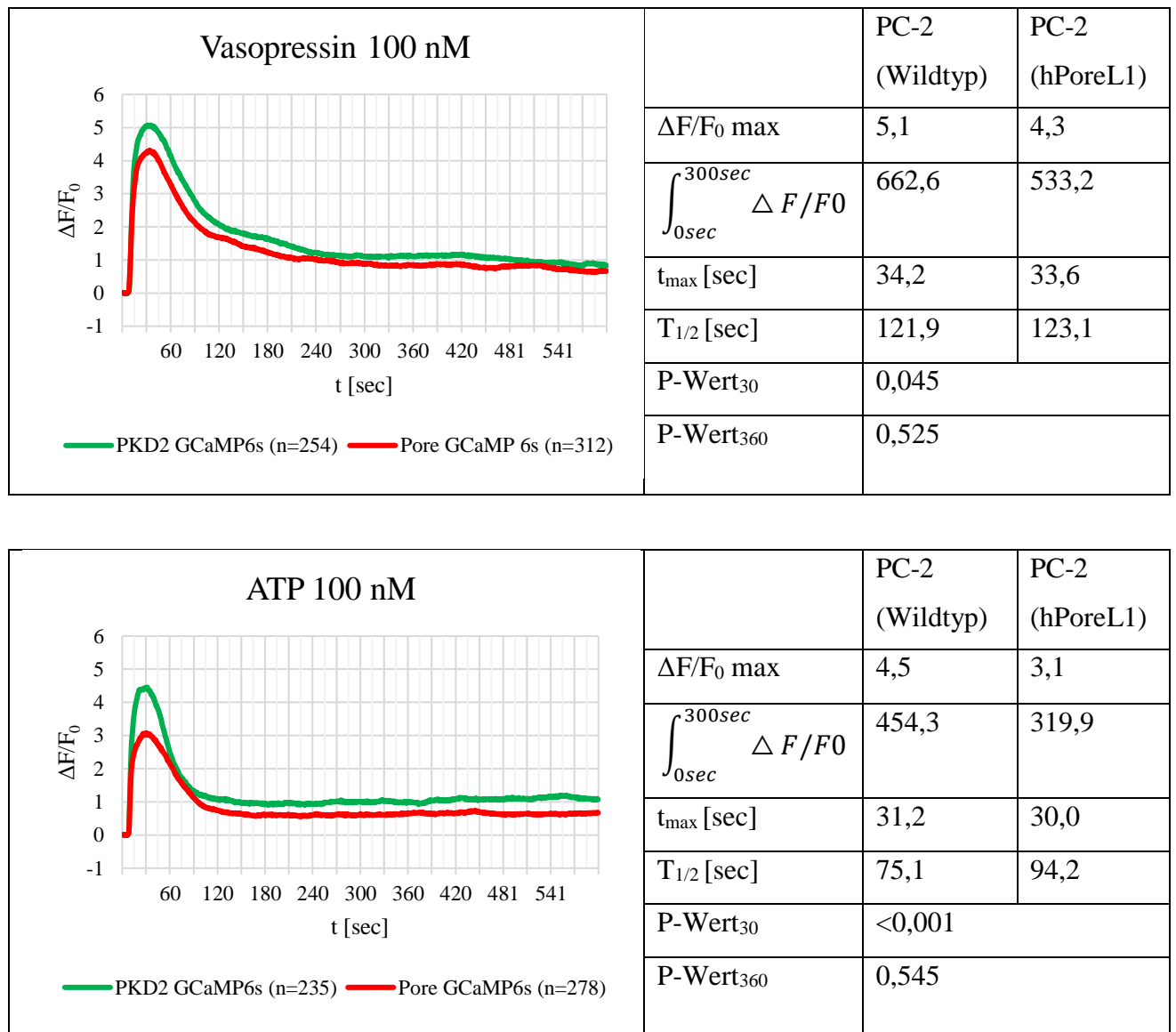
Als nächstes wurde Vasopressin ersetzt durch ATP (1 μM), ansonsten wurden die Versuchsbedingungen nicht verändert. Auch hier zeigten beide Konstrukte einen raschen Anstieg der Fluoreszenz, welcher danach wieder langsam zurückging, allerdings nach ca. 4 min in einen neuerlichen Anstieg überging.



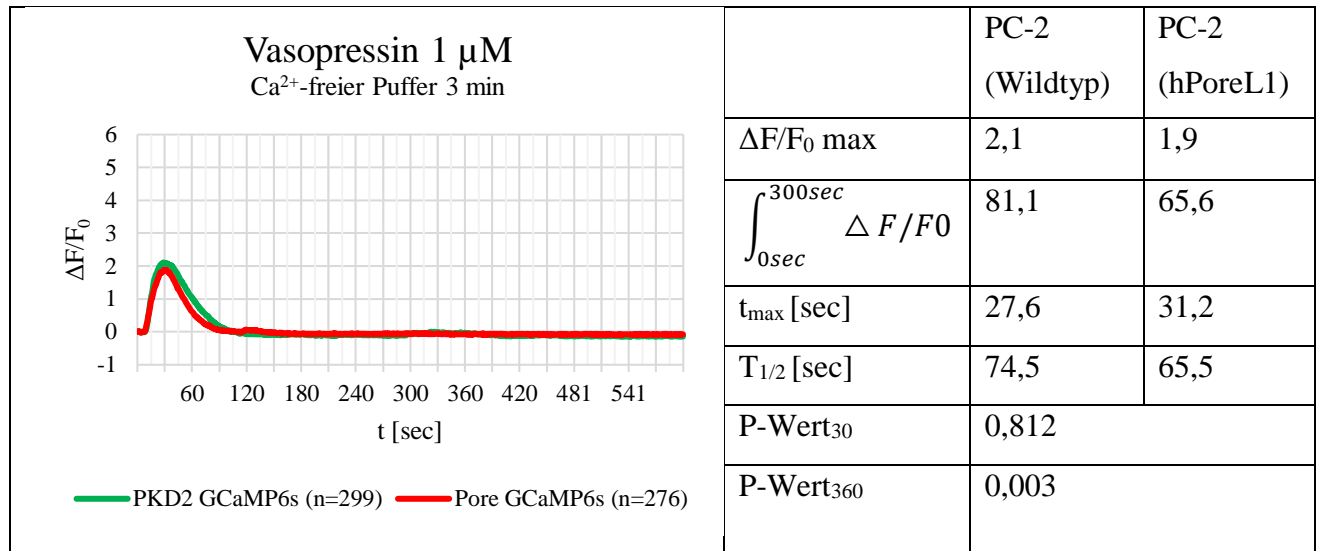
Analog zu der Versuchsreihe mit Vasopressin zeigte auch hier der Wildtyp fast ausschließlich eine größere Fluoreszenzintensität als das Polycystin-2(hPoreL1)-Protein, der Unterschied bei $\Delta F/F_0 \text{ max}$ ist mit 5,1 zu 3,7 fast identisch zur Vasopressin-Versuchsreihe. Der Test auf Signifikanz ist sowohl bei 30 sec. ($p = 0,001$) als auch bei 360 sec. ($p = 0,003$) positiv. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenz zeigt keinen so deutlichen Unterschied wie bei den Vasopressin-Versuchen (25,8 vs. 28,8 sec).

In zwei weiteren Versuchsreihen wurde die Konzentration von ATP und Vasopressin auf 100 nM, bei ansonsten identischen Bedingungen, reduziert. Die Ergebnisse waren hinsichtlich der Unterschiede beim initialen Fluoreszenz-Anstieg kongruent mit den vorherigen Versuchen und obwohl die Differenz geringer ausfiel, blieb sie trotzdem signifikant. Nach dem Abklingen des initialen Ca^{2+} -Anstiegs fanden sich aber bei diesen Messungen keine

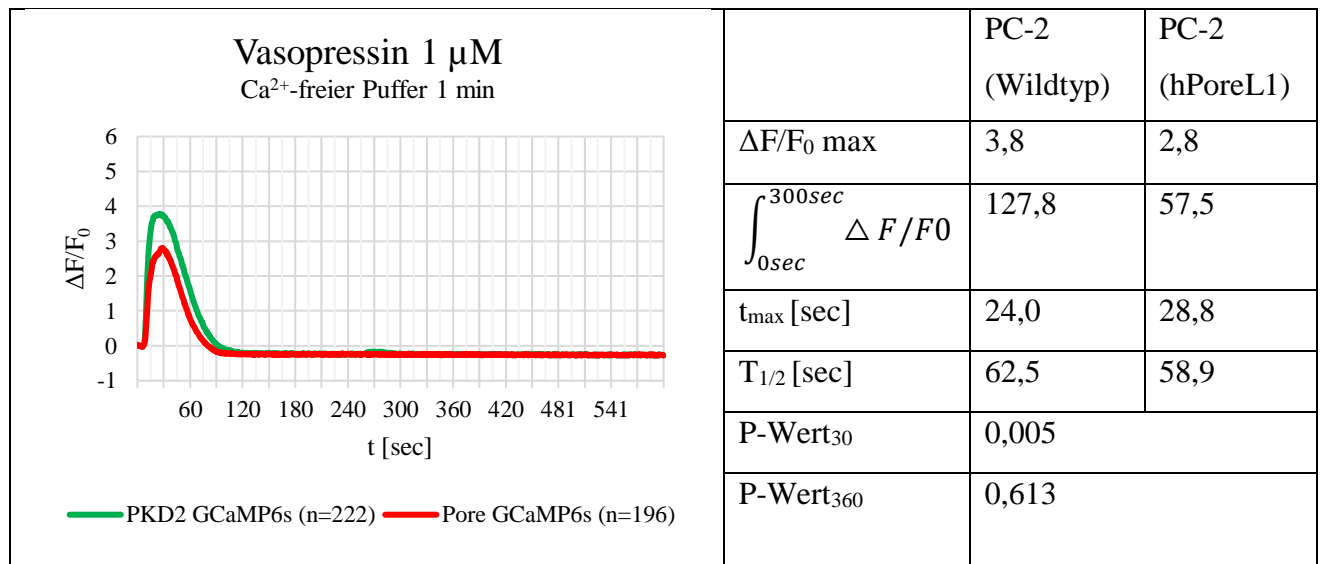
signifikanten Unterschiede mehr und die bei ATP 1 μM vorhandene zweite Signalerhöhung trat bei ATP 100 nM bei beiden Konstrukten nicht mehr auf.



Bei der nächsten Versuchsreihe wurde zur Stimulation der Zellen wieder Vasopressin (1 μM) verwendet, die Zellen waren aber diesmal sowohl während der Messung als auch für 3 min unmittelbar davor in Ca^{2+} -freiem Puffer. Die Resultate unterschieden sich dahingehend von den bisherigen Ergebnissen, dass der Anstieg deutlich geringer ausfiel ($\Delta F/F_0 \text{ max}$ 2,1 vs. 5,0 beim Wildtyp und 1,9 vs. 3,7 bei der Mutante) und auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Konstrukten bestand. Nach Erreichen des Maximums war der Abfall deutlich schneller ($T_{1/2}$ 74,5 vs. 134 sec. bzw. 65,5 vs. 156,2 sec.) und das Endniveau lag diesmal nicht über, sondern unter dem Ausgangswert.



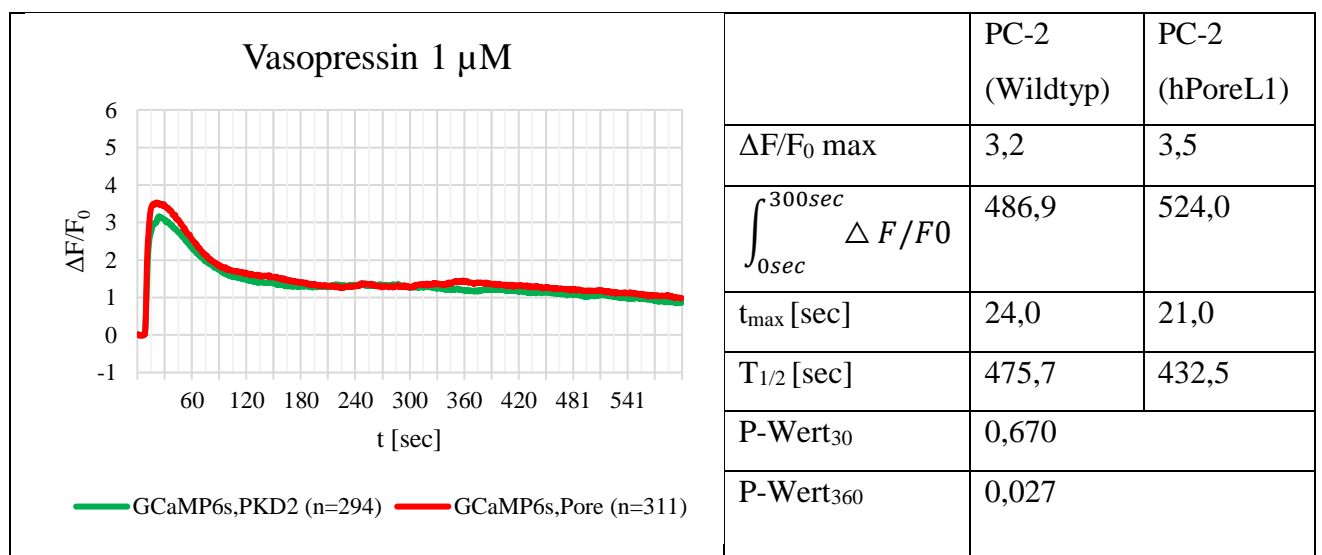
Auch bei einer Verkürzung der Zeit in Ca²⁺-freiem Puffer vor der Messung auf 1 min war der initiale Fluoreszenzanstieg geringer, der Abfall schneller und das Endniveau unter dem Ausgangswert. Allerdings näherten sich nun die Werte für $\Delta F/F_0$ max wieder denen im Ca²⁺-haltigem Puffer an (3,8 für den Wildtyp und 2,8 bei Polycystin-2(hPoreL1)) und das initiale Anstiegsverhalten zwischen den Konstrukten war signifikant unterschiedlich ($p = 0,005$).



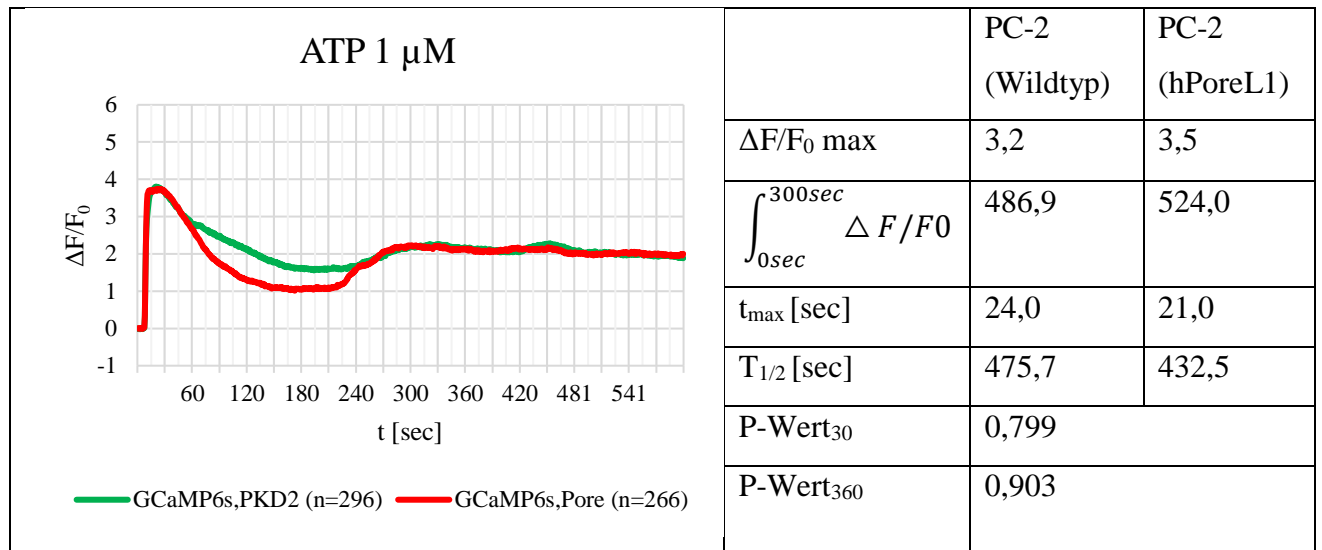
Nach diesen Versuchen wurden auch die anderen beiden Konstrukte pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA und pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2 (hPoreL1), HA zu Messungen herangezogen, also jene, bei denen GCaMP6s nicht am C-Terminus, sondern am N-Terminus von Polycystin-2 saß.

Zunächst wurden wieder Vasopressin (1 μ M) und Ca²⁺-haltiger Puffer verwendet. Die Morphologie der, bei der Auswertung erhaltenen, Kurven ähnelte stark denen der Versuche

mit den anderen beiden Konstrukten, allerdings waren diesmal die Kurven der beiden Konstrukte fast deckungsgleich. Der initiale Fluoreszenzanstieg für Polycystin-2(hPoreL1) war sogar größer als der für das Wildtyp-Konstrukt, der Unterschied war aber nicht signifikant ($p = 0,670$). Was zusätzlich auffiel, war, dass der Wert von $\Delta F/F_0$ max, zumindest beim Wildtyp-Protein, deutlich geringer ausfiel als bei dem Konstrukt mit GCaMP6s am N-Terminus (3,2 vs. 5,0). Bei Polycystin-2(hPoreL1) war der Unterschied zwischen den Konstrukten mit GCaMP6s am C- bzw. N-Terminus deutlich geringer (3,5 vs. 3,7). Das Endniveau befand sich bei dieser Versuchsreihe wieder bei ca. dem Doppelten des Ausgangswertes.



Auch nach einem Ersetzen von Vasopressin durch ATP (1 μ M) waren die Kurven von Wildtyp und Mutante größtenteils deckungsgleich mit keinem signifikanten Unterschied ($p = 0,799$). Die Werte von $\Delta F/F_0$ max lagen wieder in dem Bereich 3,7-3,8, was für den Wildtyp eine deutliche Reduktion darstellt, während das mutierte Protein wie bereits gezeigt auch bei den Versuchen mit GCaMP6s am N-Terminus ähnliche Werte erreichte.



Davon ausgehend, dass die Fluoreszenz mit der zytosmatischen Ca^{2+} -Konzentration korrelierte, lässt sich zusammenfassend sagen, dass es bei den Zellen nach der Zugabe von ATP oder Vasopressin zu einem schnellen Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels kam, welcher dann langsam wieder abnahm, allerdings auf einem Wert über dem Ruhewert blieb. Bedingt dadurch, dass sich diese erhöhten Endwerte bei Versuchsreihen in Ca^{2+} -freiem Puffer nicht finden ließen, lässt sich vermuten, dass dabei Ca^{2+} -Ströme von extrazellulär und nicht aus dem endoplasmatischen Retikulum eine Rolle spielten und daher Polycystin-2 hier keinen direkten Einfluss hatte. Betrachtet man den initialen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, so gibt es einerseits Versuchsreihen, bei denen der Wildtyp einen signifikant größeren Anstieg aufwies, andererseits gibt es auch Versuchsreihen bei denen sich das Polycystin-2 und Polycystin-2(hPoreL1) nicht signifikant unterschieden. Mögliche Interpretationen dieser Versuche werden unter 4.1.2. diskutiert.

4. Diskussion

4.1. Interpretation der Ergebnisse

4.1.1. mRNA- und Proteinnachweis

Im Zuge dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass die neue mutierte Form von Polycystin-2, Polycystin-2(mPoreL1), von Knock-In-Mäusen erfolgreich transkribiert und translatiert wird.

Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass Polycystin-2(mPoreL1) auf die gleiche Weise intrazellulär lokalisiert wie Polycystin-2, was den Erwartungen entsprach, in Anbetracht der Tatsache, dass nur die Porenregion modifiziert wurde, die intrazelluläre Verteilung aber durch das ER-Retentionssignal am C-Terminus und das RVxP-Motiv am N-Terminus festgelegt wird^(13, 73).

Es zeigte sich allerdings auch, dass die Konzentrationen der *Pkd2*-mRNA in den Knock-In-Mäusen, vor allem bei den homozygoten Tieren (unabhängig vom genetischen Hintergrund), geringer waren. Mögliche Ursachen hierfür könnten eine verminderte Transkriptionsrate, beispielsweise durch eine veränderte Bindung von Transkriptionsfaktoren, oder ein Abbau der mRNA, unter Umständen mittels RNA-Interferenz, sein^(124, 125). Fundierte Aussagen lassen sich hierzu aber nicht treffen, da keine Experimente in dieser Richtung durchgeführt wurden.

Bei der Quantifizierung des Western Blots bestätigten sich die Ergebnisse aus der qPCR, erneut entsprach die Konzentration der Mutante in homozygoter Form nur ca. 30% der Konzentration des Wildtyps. Dies zeigt zum einen, dass sich die veränderte mRNA-Konzentration auch relevant auf die Proteinkonzentration auswirkt, welche letztendlich für den Phänotyp ausschlaggebend ist. Zum anderen spricht dieses Ergebnis auch dafür, dass die Translation der mutierten mRNA mit einer vergleichbaren Effizienz wie beim Wildtyp abläuft und dass das entstehende Protein Polycystin-2(mPoreL1) eine vergleichbare Halbwertszeit wie Polycystin-2 hat, da andernfalls die Konzentrationsunterschiede im Vergleich zur qPCR noch zunehmen hätten müssen.

Auch die Tatsache, dass homozygote Knock-In-Mäuse lebend und nicht tot geboren werden, erhärtet die Hypothese, dass es gelungen ist, eine (zumindest teilweise) funktionelle Variante von Polycystin-2 zu kreieren, da bei einer Knock-Out-Variante bei homozygoten Tieren keine Lebendgeburt zu erwarten wäre⁽⁸⁷⁾.

Der Fakt jedoch, dass Polycystin-2(hPoreL1) in verringerter Menge vorhanden ist, macht es zunächst schwierig, festzulegen, ob der Phänotyp der Mäuse bedingt wird durch ein verändertes Leitverhalten von Polycystin-2(mPoreL1) gegenüber Ca^{2+} oder ob lediglich ein Dosiseffekt vorliegt (siehe auch 4.1.3.1.).

4.1.2. Ca^{2+} -Imaging

Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit pIRES2-DsRed-Express/PKD2, HA, GCaMP6s und pIRES2-DsRed-Express/PKD2(hPoreL1), HA, GCaMP6s im Ca^{2+} -haltigem Puffer sprachen zuerst eindeutig dafür, dass die Zellen mit der mutierten Form zu einer geringeren Ca^{2+} -Antwort fähig sind als die Zellen mit dem Wildtyp-Konstrukt. In der Versuchsreihe mit Ca^{2+} -freiem Puffer für 3 min zeigte sich dann jedoch kein signifikanter Unterschied mehr, der stärkere Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration war allerdings bei einer Verkürzung der Zeit in Ca^{2+} -freiem Puffer auf 1 min wieder vorhanden.

Burnatowska-Hledin et al. führten Versuche an LLC-PK₁-Zellen durch, die sie mit Vasopressin (1 μM) stimulierten, um dann deren intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zu messen. Sie verwendeten dabei unter anderem auch Ca^{2+} -freien Puffer und konnten zeigen, dass nach 5 min ohne extrazelluläres Ca^{2+} die LLC-PK₁-Zellen nach Vasopressin-Zugabe keinen Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} aufwiesen, nach 1 min ohne extrazelluläres Ca^{2+} jedoch schon.⁽¹²⁶⁾

Bezieht man diese Ergebnisse in die Betrachtung mit ein und beachtet, dass $\Delta F/F_0$ beim Wildtyp Polycystin-2 bei Ca^{2+} -haltigem Puffer 5,0 betrug, nach 1 min ohne Ca^{2+} 3,8 und nach 3 min nur noch 2,1 und dass bei Polycystin-2(hPoreL1) ähnliche Werte vorlagen (3,7 vs. 2,8 vs. 1,9), so zeichnet sich ab, dass proportional zur Zeit ohne extrazelluläres Ca^{2+} die Zellen immer schwächer reagieren, vermutlich aufgrund der Depletion der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (also v.a. das endoplasmatische Retikulum).

Möglicherweise führt dies nach 3 min zu einer derartigen Verringerung des maximalen intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs, dass die schlechtere Leitfähigkeit von Polycystin-2(hPoreL1) nicht mehr relevant ist, beziehungsweise statistisch nicht mehr nachweisbar wird (oder einer noch größeren Zellzahl bedurft hätte, um nachweisbar zu bleiben). Die Tatsache, dass nach 1 min in Ca^{2+} -freiem Puffer noch ein signifikanter Unterschied bleibt, unterstützt des Weiteren auf jeden Fall die Hypothese, dass das (am endoplasmatischen Retikulum lokalisierende) Polycystin-2(hPoreL1) für den geringeren Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich ist und nicht ein artifizieller Strom von extrazellulär.

Generell zeigen die Kurven der Ca^{2+} -Antwort nach Zugabe von Vasopressin große Ähnlichkeiten zu Experimenten, welche an untransfizierten LLC-PK₁-Zellen vorgenommen wurden und die als Triggersubstanz für die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung ebenfalls Vasopressin (100 nM - 1 μM) verwendeten. So wird beispielsweise bei Weinberg et al. auch davon berichtet, dass es nach Zugabe von Vasopressin zu einem initialen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt, welche nach 5-6 min auf einen Wert abfällt, der ca. doppelt so hoch ist wie der Basalwert, was durchaus vergleichbar ist mit den Werten in dieser Arbeit⁽¹²⁷⁾. Tang et al. führten auch Versuche mit Vasopressin an LLC-PK₁-Zellen durch und beschrieben ebenfalls, dass einige Zellen anschließend eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration hatten, welche über dem Basalwert lag⁽¹¹⁰⁾. Des Weiteren zeigen die Ca^{2+} -Konzentrationskurven von Ausiello et al. (welche allerdings an Mesangiumzellen erstellt wurden) nach der Zugabe von Vasopressin vom Verlauf der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen her große Homologien zu den hier erstellten Kurven⁽¹⁰⁴⁾. Aufgrund dieses ähnlichen Verhaltens ist davon auszugehen, dass durch die Transfektion der GCaMP-Polycystin-2-Konstrukte keine großen Artefakte in der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase verursacht wurden. Allerdings muss man zurückhaltend damit sein die Werte der GCaMP-Fluoreszenzänderung direkt mit Ca^{2+} -Konzentrationen aus anderen Arbeiten zu vergleichen, da gezeigt wurde, dass sich die Fluoreszenzänderung nicht linear zur Ca^{2+} -Konzentration verhält⁽¹²⁸⁾.

Die Tatsache, dass sich dann jedoch bei den Versuchen mit pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2, HA und pIRES2-DsRed-Express/GCaMP6s, PKD2(hPoreL1), HA keine signifikanten Unterschiede mehr finden lassen, erschwert die Interpretation der Daten. Betrachtet man wieder die $\Delta F/F_0$ -Werte, diesmal zwischen den Konstrukten mit GCaMP6s am C-Terminus und denen mit GCaMP6s am N-Terminus, fällt auf, dass die Werte bei C-terminalem GCaMP6s beim Wildtyp höher ausfallen (5,0 vs. 3,2), bei Polycystin-2(hPoreL1) zeigt sich ein geringerer Unterschied (3,7 vs. 3,5). Analog zu den Versuchen mit Ca^{2+} -freiem Puffer kann man die Hypothese aufstellen, dass es durch den Wechsel von GCaMP6s vom C-Terminus an den N-Terminus beispielsweise zu (geringfügigen) Konformationsänderungen kommt, welche die Leitfähigkeit dergestalt verringern, dass die veränderte Porenregion nicht mehr der limitierende Faktor für den Ca^{2+} -Strom ist.

Zieht man die Sequenzänderung in die Überlegungen mit ein (siehe Abbildung 1.3 in der Einleitung), so erkennt man, dass bei Polycystin-2(hPoreL1) in der Summe in der Porenregion weniger negative Ladungen vorliegen als bei Polycystin-2 (Insgesamt verschwinden drei

negative Ladungen in Form von Glutaminsäure, dafür enthält die Porenregion von Polycystin-2(hPoreL1) eine positive Ladung, in Form von Lysin, mehr). Da Ca^{2+} als Kation von negativen Ladungen angezogen und von positiven Ladungen abgestoßen wird, kann man sich vorstellen, dass die Sequenzänderungen zu einer schlechteren Leitfähigkeit beitragen. Nach dieser Überlegung wären demnach auch die Ergebnisse der Messung mit GCaMP6s am C-Terminus die valideren.

Des Weiteren ist laut Untersuchungen des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg bei Polycystin-2(hPoreL1) die Porenregion enger als bei Polycystin-2, was ebenfalls eher für eine schlechtere Leitfähigkeit sprechen würde.

Fest zu halten bleibt, dass durch die GCaMP-Messungen gezeigt werden konnte, dass die Zellen mit Polycystin-2(hPoreL1) auf jeden Fall zu keiner größeren Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern fähig sind als die Zellen mit Polycystin-2. Wahrscheinlich kommt es durch die Mutation der Porenregion sogar zu einer verminderten Leitfähigkeit, es konnte aber nicht sicher ausgeschlossen werden, dass doch kein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp hinsichtlich der Ca^{2+} -Leitfähigkeit besteht.

4.1.3. Phänotyp der Mäuse

4.1.3.1. Grundlagen des Phänotyps

Die Frage nach der Grundlage des Phänotyps der Knock-In-Mäuse (signifikant größere Sammelrohre und zusätzlich Zystenentwicklung beim 129/Sv-Hintergrund) ist insofern nicht leicht zu klären, da einerseits in den Knock-In-Mäusen die Dosis von Polycystin-2(mPoreL1) verringert war und andererseits auch die Ergebnisse der GCaMP-Messung zwar die Hypothese einer geringeren Ca^{2+} -Leitfähigkeit für die mutierte Variante favorisierten, aber nicht abschließend bewiesen.

Wenn man jedoch zusammennimmt, dass einerseits die Modifikation der Porenregion laut GCaMP-Messungen die Leitfähigkeit für Ca^{2+} zumindest nicht verbessert, vermutlich sogar verschlechtert hat und dass andererseits in den Knock-In-Mäusen weniger Protein vorhanden ist, so kann man auf jeden Fall festhalten, dass bei den Mäusen in der Summe auf zellulärer Ebene eine verminderte Ca^{2+} -Leitfähigkeit vorliegt. Diese kann entweder bedingt sein durch eine reduzierte Anzahl an Ca^{2+} -Kanälen oder aber durch eine Kombination aus reduzierter Anzahl und zusätzlich vermindertem Ca^{2+} -Strom über den individuellen Kanal.

Somit lässt sich vermuten, dass der Phänotyp der Mäuse durch einen reduzierten Ca^{2+} -Strom verursacht wird. Wobei einschränkend auch gesagt werden muss, dass Polycystin-2 beispielsweise an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist⁽⁸⁴⁾, was durchaus auch als Grundlage für den Phänotyp der Mäuse in Betracht kommt, da mit steigender Zellteilungsrate auch der Umfang der Tubuli zunehmen könnte.

Auch andere reduzierte Protein-Protein-Wechselwirkungen könnten den Phänotyp mitbedingen. Allerdings konnte in einem Experiment von Koulen et al. gezeigt werden, dass die Polycystin-2-Mutante D511V sich (soweit untersucht) einzig und allein dadurch auszeichnet, dass sie die Leitfähigkeit für Ca^{2+} verloren hat und zur ADPKD führt⁽⁵¹⁾. Dieses Erkenntnis macht es wahrscheinlich, dass der Phänotyp von ADPKD-Patienten und der Knock-In-Mäuse durch eine reduzierte Kanalfunktion von Polycystin-2 verursacht wird und nicht durch das Fehlen von Polycystin-2 in anderen Interaktions-Kaskaden, wobei dies natürlich aggravierend wirken kann.

4.1.3.2. Interpretationen des Phänotyps und Vergleich zu anderen Mauslinien

Die interessanteste Eigenschaft des Phänotyps der Knock-In-Mäuse ist wohl, dass es durch die Mutation zu einem signifikanten Anstieg der Durchmesser der Sammelrohre kam. Dies kann als Bestätigung der Hypothese aufgefasst werden, dass ein Regelkreis zur Definition der Lumengröße existiert.

Der Phänotyp der Mäuse ist aber auch insofern bemerkenswert, als dass einerseits die Zystenentstehung nur beim 129/Sv-Hintergrund stattfindet und andererseits sich die Veränderungen (Zysten und gesteigerter Tubulusdurchmesser) auf das Sammelrohr konzentrieren. Bedingt dadurch, dass *Pkd2* vor allem im Sammelrohr und im distalen Tubulus exprimiert wird⁽⁷⁵⁾, waren zwar im Sammelrohr bei den Knock-In-Mäusen Anomalien zu erwarten, dass aber der distale Tubulus keinerlei Veränderungen in dieser Art zeigte (keine Zysten und kein signifikanter Unterschied bei den Tubulusdurchmessern) war unerwartet.

Wu et al. untersuchten Mauslinien mit *WS25*- und Knock-out-Allelen (siehe auch Einleitung), die auch eine reduzierte Menge an *Pkd2*-mRNA hatten und ebenfalls Zysten aufwiesen, unter anderem auf den Zystenursprung hin und fanden Zysten aus allen Nephronabschnitten mit Bevorzugung der distalen Anteile (42% distaler Tubulus und 40% Sammelrohr)⁽⁴⁴⁾. Generell war vor allem der renale Phänotyp der *WS25*-Mäuse vergleichbar mit dem der hier untersuchten Tiere, die strikte Beschränkung des Zystenursprungs auf das Sammelrohr bei den p/p-Mäusen ist aber ein deutlicher Unterschied. Des Weiteren hatten alle der untersuchten

WS25/--Mäuse Leberzysten⁽⁴⁴⁾, wohingegen bei den *p/p*-Mäusen keine Leberzysten beobachtet werden konnten. Auch bei den *WS25/WS25*-Mäusen hatte immerhin ein Fünftel der Mäuse Leberzysten, allerdings zeigte nur noch ca. die Hälfte bilaterale Nierenzysten und bei den *+/-*-Mäusen waren nur noch unilaterale Zysten beschrieben worden⁽⁴⁴⁾. Außerdem hatten die *+/-*-Mäuse nur 1-2 Nierenzysten, wohingegen die *p/p*-Mäuse mit 129/Sv-Hintergrund ca. 10 Zysten pro 7 µm-Schnitt aufwiesen, zusätzlich lagen bei fast allen dieser Tiere bilaterale Nierenzysten vor⁽⁸⁶⁾.

Der renale Phänotyp der Knock-out- und *WS25*-Mäuse ist somit milder als bei den *p/p*-Mäusen mit 129/Sv-Hintergrund, während das Auftreten von Leberzysten im Gegensatz dazu häufiger ist. Dies kann als ein Hinweis darauf gesehen werden, dass auch die veränderte Porenregion zum Phänotyp der *p/p*-Mäuse beiträgt. Wobei einschränkend gesagt werden muss, dass es bei den *WS25*-Mäusen individuell starke Unterschiede bezüglich der Polcystin-2-Konzentration gibt⁽⁴⁴⁾, wodurch es z.B. auch sein kann, dass einzelne Mäuse noch weniger Protein aufweisen als die *p/p*-Mäuse, was dann die Zysten im distalen Tubulus bedingen könnte. Allerdings ist bei den *WS25*-Mäusen der Anteil an Zysten im distalen Tubulus mit 42% sogar höher als der Anteil der Sammelrohrzysten und daher nur schlecht durch ein selektives Phänomen in einzelnen Tieren zu erklären. Auch die Tatsache, dass bei den C57Bl/6-Mäusen keine Zysten auftraten, macht einen reinen Dosiseffekt unwahrscheinlich.

Eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass bei beiden genetischen Hintergründen (sowohl C57Bl/6 als auch 129/Sv) die Mäuse des Genotyps *p/p* signifikant größere Sammelrohre aufweisen als die Mäuse des Genotyps *+/+*, eine Zystenentwicklung aber nur bei den *p/p*-Mäusen der Mauslinie 129/Sv stattfand, wäre die Third-Hit-Hypothese der Zystenentstehung bei der ADPKD. Gemäß dieser Hypothese müssen zusätzlich zum Verlust beider *PKD2*-Allele noch nephrotoxische Einflüsse auftreten, um eine Zystenbildung zu initiieren^(45, 46). Möglicherweise läuft die Entstehung der Zysten in den *p/p*-Mäusen ähnlich ab und die 129/Sv-Mäuse sind empfänglicher für derartige Einflüsse.

Eine andere potentielle Erklärung für die Tatsache, dass die C57Bl/6-Mäuse keine Zysten aufweisen, ergibt sich aus der Betrachtung der Größen der Tubulusquerschnitte. In beiden Mauslinien sind die Sammelrohre in den *p/p*-Mäusen größer, allerdings sind auch die Sammelrohre der *p/p*-129/Sv-Mäuse deutlich größer als die der *p/p*-C57Bl/6-Mäuse (Median 444,54 µm² vs. 116,95 µm²). Es könnte demnach möglich sein, dass die Zystenentstehung in den *p/p*-Mäusen nicht durch den Einfluss nephrotoxischer Einwirkungen initiiert wird, sondern dass vielmehr eine Grenze des diskutierten Regelkreises, der die Lumengröße

reguliert, in einigen Tubuli der p/p-129/Sv-Mäuse überschritten wird, wodurch der Regelkreis entweder nicht mehr funktioniert oder vielleicht sogar zum Zystenwachstum beiträgt. Bei den C57Bl/6-Mäuse hingegen bestünde gemäß dieser Hypothese aufgrund der generell engeren Sammelrohre (auch bei den p/p-Tieren) noch genug Spielraum nach oben, so dass es bei diesen Mäusen nicht zu einer Inaktivierung der Kontrollmechanismen käme.

Die Tatsache, dass in den 129/Sv-Mäusen die Zysten nur in den Sammelrohren entstehen, kann als Erhärtung für letztere Hypothese aufgefasst werden, da schon bei den Wildtyp-Mäusen die Fläche der Sammelrohre größer ist als die der distalen Tubuli (Median 189,67 μm^2 vs. 65,51 μm^2). Ein Unterschied, der dann bei den homozygoten Knock-In-Mäusen nochmal deutlich zugenommen hat (Median 444,54 μm^2 vs. 68,59 μm^2). Es ist folglich gut möglich, dass das Zystenwachstum in den Knock-In-Mäusen durch ein Wachstum des gesamten Sammelrohres ausgelöst wird, denn würde es auf den gleich Mechanismen wie bei ADPKD-Patienten beruhen (Verlust beider Allele), würden die Zysten wie bei ADPKD aus allen Nephronabschnitten hervorgehen⁽¹²⁹⁻¹³²⁾. Allerdings beschrieben manche Autoren, dass auch bei ADPKD die meisten bzw. alle Zysten dem Sammelrohr entspringen^(133, 134) und wohl auch die frühesten Zysten bei ADPKD von dort stammen⁽⁵⁾, was dafür spricht, dass das Sammelrohr wohl der vulnerabelste Teil des Nephronsystems in dieser Hinsicht ist. Möglich ist auch, dass, anders als im Sammelrohr, im distalen Tubulus noch weitere Regulationsmechanismen existieren, die ein Wachstum des Lumens auch nach teilweisem Funktionsverlust von Polycystin-2 hemmen. Bedingt durch die Tatsache, dass Polycystin-2 beispielsweise im proximalen Tubulus kaum exprimiert wird, stellt sich auch die Frage, ob ein potentieller Regelkreis, der Polycystin-2 involviert, unter Umständen auf gewisse Nephronabschnitte beschränkt ist und in anderen Abschnitten durch andere Mechanismen geregelt wird.

Dies wäre auch eine potentielle Erklärung für die Unterschiede zu den WS25-Mäusen von Wu et al.. Es besteht auch durchaus die Möglichkeit, dass hier unterschiedliche Mechanismen die Zystenbildung initiieren. Bei den WS25-Mäusen entstehen die Zysten vermutlich durch einen „second-hit“-Mechanismus, während sie bei den p/p-Mäusen durch einen fehlgesteuerten Regelkreis bedingt sein könnten. Dies würde auch erklären, warum die p/p-Mäuse mehr renale Zysten haben bei ansonsten milderem Phänotyp. Der Regelkreis ist bei diesen Tieren überall (zumindest in den Sammelrohren) fehlgesteuert, während eine somatische Inaktivierung eines Allels seltener auftritt. Da die vorliegenden Ergebnisse darauf hindeuten, dass der Regelkreis vor allem im Sammelrohr eine Rolle spielt, wäre dies die Erklärung,

warum bei den WS25-Mäusen auch andere Nephronabschnitte betroffen sind. Die Tatsache, dass bei den p/p-Mäusen keine einzige Zyste außerhalb des Sammelrohres beobachtet wurde, würde somit ebenfalls dafür sprechen, dass auch eine Reduktion der Polycystin-2-Menge auf ca. 15 % keine Zystenbildung auslöst (was den Wert nach der somatischen Inaktivierung eines der beiden p-Allele in einer p/p-Maus darstellt). Die Größe der Tubuli wurde bei den WS25-Mäusen aber leider nicht ausgewertet, was die Aussagekraft dieser Hypothese schmälert, sie erscheint aber trotzdem als logische Erklärung für die beobachteten Phänomene.

4.2. Überlegungen zum potentiellen Mechanismus des Regelkreises

4.2.1. Ca^{2+} als zentraler Baustein bei ADPKD (und eines potentiellen Regelkreises)

Wie oben bereits diskutiert, kann zumindest angenommen werden, dass eine verringerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration für den Phänotyp der p/p-Mäuse verantwortlich ist. Hier sollen noch andere intrazelluläre Signalwege dargestellt werden, die bei ADPKD und den Knock-In-Mäusen unter Umständen von Relevanz sein könnten.

Auch wenn es bisher noch keine weitere Arbeit gab, die sich mit dem Tubulusdurchmesser beschäftigte, so wurden doch verschiedene Signalkaskaden auf ihre Rolle bei der Zystenentstehung und dem Zystenwachstum bei ADPKD hin untersucht. Beispielsweise spielt cAMP eine große Rolle bei der Zellproliferation im Epithel der Zysten und somit beim Zystenwachstum⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾. Diese Funktion von cAMP ist allerdings keineswegs physiologisch, bei normalen Nephron-Zellen hemmt cAMP die Zellproliferation durch Inhibition des Ras/Raf-1/MEK/ERK-Signalwegs an der Stelle des Raf-1⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾. Erst durch die niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel bei ADPKD kommt es zur Funktionsumkehr, da nun cAMP (über PKA und Ras) B-Raf aktivieren kann, was wiederum zur Aktivierung von MEK und ERK führt und damit zur gesteigerten Zellproliferation^(136, 137). Hintergrund dieses Phänomens ist die Tatsache, dass Ca^{2+} aktivierend auf PI3K wirkt, welche wiederum den B-Raf-Inhibitor Akt stimuliert. Daher führen niedrige Ca^{2+} -Spiegel zu einer Enthemmung von B-Raf, welches dann von cAMP aktiviert werden kann und die Zellproliferation anregt.⁽¹³⁷⁾

Zusätzlich führen niedrige Ca^{2+} -Konzentrationen zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration, vermutlich durch eine Hemmung von Phosphodiesterasen (v.a. PDE 4), welche normalerweise cAMP abbauen⁽¹³⁸⁾. Es konnte nachgewiesen werden, dass *Pkd2*^{+/-}-Zellen aus glatter Gefäßmuskulatur ca. die halbe Menge an PC-2 enthielten wie *Pkd2*^{+/+}-Zellen und eine um ca. 17% verringerte Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration, was bereits zu deutlichen Anstiegen der

cAMP-Konzentration führte^(138, 139). Diese Zellen hatten auch eine erhöhte Proliferationsrate, allerdings wurde dieser Effekt nicht durch cAMP vermittelt. Im Gegenteil führte cAMP, bedingt durch das Fehlen der 95kD-Variante von B-Raf in dieser Zelllinie zu einer Hemmung der Proliferation⁽¹³⁸⁾. Auch mit Ca^{2+} -Antagonisten behandelte *Pkd2*^{+/+}-Zellen zeigten eine vermehrte Zellteilungsrate, was bedeutet, dass niedrige Ca^{2+} -Konzentrationen unabhängig von cAMP ein vermehrtes Zellwachstum verursachen können.⁽¹³⁸⁾

Die Bedeutung der Dysregulation des cAMP-Signalwegs wird nicht zuletzt durch die Einführung des Medikaments Tolvaptan unterstrichen, einem V2-Rezeptor-Antagonist zur Behandlung der ADPKD, welches in den Hauptzellen des Sammelrohres die cAMP-Level reduziert und damit das Zystenwachstum verlangsamt⁽¹⁴⁰⁻¹⁴⁴⁾. Interessant daran ist auch, dass der Angriffspunkt dieses Medikaments der Nephronabschnitt ist, der sich auch in den vorliegenden Experimenten als besonders vulnerabel für die Entstehung von Zysten gezeigt hat.

Ein weiterer Signalweg der im Zentrum der Aufmerksamkeit bei ADPKD steht, ist der Wnt-Signalweg, welcher sich aufgliedert in einen kanonischen, einen nicht-kanonischen und einen Wnt- Ca^{2+} -Signalweg, welcher vermutlich die beiden anderen beeinflusst^(145, 146). Bei ADPKD kommt es zu einer Fehlregulation der Wnt-Signalwege mit einer Überaktivität des kanonischen Wegs, was zu einer überschießenden Zellproliferation führen kann⁽¹⁴⁶⁾. Bemerkenswert ist, dass eine hohe Aktivität von β -Catenin, die bei einer Überaktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs auftreten kann, bei Versuchstieren einen polyzystischen Phänotyp hervorruft⁽¹⁴⁷⁾. Es gibt Theorien, dass ein extrazellulärer Ca^{2+} -Einstrom, u.U. über einen mechanischen Stimuli vermittelt, nötig ist, um den kanonischen Wnt-Weg zu hemmen und den nicht-kanonischen zu aktivieren, welcher zu einer Hemmung der Proliferation und einer Aufrechterhaltung der planaren Zellpolarität führt^(146, 147). Allerdings ist der kanonische Signalweg nicht per se pathologischer Natur, sondern ein wichtiger Baustein in der frühen Nierenentwicklung. Erst später ist ein durch Inversin vermitteltes Umschalten auf den nicht-kanonischen Signalweg nötig, um die normale Nierenarchitektur zu erhalten⁽¹⁴⁸⁾. Möglicherweise wird diese Aktivitätsverlagerung vom kanonischen zum nicht-kanonischen Weg hin ausgelöst durch den einsetzenden Urinfluss⁽¹⁴⁸⁾. Dies würde zu Regulation der Wnt-Wege durch intrazelluläres Ca^{2+} passen, wenn man davon ausgeht, dass der Urinfluss bzw. gewisse Substanzen im Urin u.a. PC-1 und PC-2 stimuliert und so zum Ca^{2+} -Einstrom führt (vergleiche auch 4.3).

Bekannt ist auch, dass *Pkd2*^{-/-}-Zellen erhöhte Level von β -Catenin aufweisen, sowie eine aberrante Ziliogenese (die primären Zilien sind verkürzt und vermindert ausgebildet) und Tubulomorphogenese⁽¹⁴⁹⁾. Des Weiteren zeigen diese Zellen eine gestörte Funktion von E-Cadherin und der Tight Junctions, was die Autoren der Experimente als Auslöser für die hohen β -Catenin-Level in Betracht ziehen⁽¹⁴⁹⁾.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es einige Signalwege gibt, die bei ADPKD dysreguliert sind. Nach aktuellem Stand sind viele aber nicht Auslöser, sondern Begleiterscheinung oder Folge der Zystogenese und es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Ca^{2+} der zentrale Baustein beim Zystenwachstum bei ADPKD ist. Dies lässt auch den Schluss zu, dass Ca^{2+} integral an einem potentiellen Regelkreis beteiligt sein könnte und dass vermutlich auch der Grund für den signifikanten Flächenzuwachs der Sammelrohre bei den p/p-Mäusen in veränderten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu suchen ist.

4.2.2. Überlegungen zum potentiellen Mechanismus des Regelkreises

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass p/p-Mäuse, vom genetischen Hintergrund unabhängig, im Durchschnitt einen größeren Sammelrohrdurchmesser besitzen als Wildtyp-Mäuse. Grund hierfür ist möglicherweise ein reduzierter Ca^{2+} -Strom via Polycystin-2, wobei im Zuge dieser Experimente nicht sicher geklärt werden konnte, ob die Reduktion des Ca^{2+} -Flusses bedingt ist durch eine Verringerung der Polycystin-2-Konzentration, der veränderten Porenregion oder einer Kombination aus beidem. Diese Beobachtungen passen zur Hypothese, dass die Größe der Tubulus-Lumina durch einen Regelkreis definiert wird, in dem Polycystin-1 und Polycystin-2 eine wichtige Rolle spielen⁽⁷⁷⁾.

Kontrovers diskutiert wurde in den letzten Jahren sowohl, ob Polycystin-1 die Rolle eines Mechano- oder Chemosensors spielt, als auch, ob das primäre Zilium, der Ort der Lokalisation von Polycystin-1 und Polycystin-2, eher der Mechano- oder Chemosensation dient^(48, 49, 50). Während ältere Daten nahelegten, dass das primäre Zilium mechanische Reize wahrnimmt und u.U. mittels Polycystin-1 und -2 in einen Ca^{2+} -Influx übersetzt, lassen neuere Experimente von Delling et al. vermuten, dass das primäre Zilium nicht als Mechanosensor fungiert, sondern dass die Ca^{2+} -Erhöhung, die durch einen mechanischen Stimulus ausgelöst wird, über das Zytoplasma ins primäre Zilium übergreift, was bei einer langsamen Bildaufnahmefrequenz eine mechanisch induzierte Ca^{2+} -Antwort im primären Zilium vortäuschen könnte⁽¹⁵⁰⁾. Hierzu passen die Erkenntnisse anderer Autoren, dass die mechanische Stimulation der apikalen Membran alleine bereits zu einem Ca^{2+} -Einstrom von

basolateral führt, welcher unter Umständen durch eine Kraftübertragung über das Zytoskelett hin zu Ca^{2+} -Kanälen oder durch die Freisetzung von ATP oder UTP ausgelöst wird⁽¹⁵¹⁻¹⁵⁴⁾. Es wurde des Weiteren beschrieben, dass auch bei den Schaltzellen des Sammelrohres, welche kein primäres Zilium besitzen, mechanische Reize zur intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung führen⁽¹⁵³⁾. Von daher rückt einerseits die Rolle des Ziliums und Polycystin-1 als Chemosensor in den Vordergrund. Andererseits wird vermutlich vor diesem Hintergrund der mögliche Regelkreis zur Regulation der Lumen-Größe über eine noch unbekannte, im Harn enthaltene, Substanz gesteuert und nicht über mechanische Stimuli.

Xu et al. stellten fest, dass Polycystin-2 durch Polycystin-1 stabilisiert und aktiviert wird⁽¹⁵⁵⁾. Dies passt zu der Tatsache, dass inaktivierende Mutationen in beiden Proteinen zu ADPKD führen^(5, 6). Würde Polycystin-1 Polycystin-2 hemmen, so käme es bei ADPKD mit einer Mutation im PKD1-Gen zu einer Enthemmung von Polycystin-2, während es bei ADPKD mit einer Mutation im PKD2-Gen zu einer Inaktivierung von Polycystin-2 käme, weswegen sich die Phänotypen unterscheiden müssten.

Ma et al. zeigten in ihren Experimenten, dass das Zystenwachstum nach Verlust des Polycystin-Komplexes durch den Funktionsverlust des Ziliums gehemmt wird, was sie zu der Hypothese führte, dass im Zilium eine Signalkaskade lokalisiert ist, welche ein schnelles Zystenwachstum fördert und durch Polycystin-1/2 inhibiert wird. Es war aber auch bereits bekannt und wurde in den Experimenten von Ma et al. bestätigt, dass der Verlust des primären Ziliums zur Zystenbildung führt, welche allerdings langsamer ist, als beim Verlust von Polycystin-1 bzw. -2.⁽⁷⁶⁾

Geht man davon aus, dass der Regelkreis mittels Chemosensation gesteuert wird, so stellt sich die Frage, welche Substanz den Liganden zu Polycystin-1 darstellt. Vermutlich müsste der Ligand innerhalb des Nephronsystems sezerniert werden, denn bei einem Übertritt in das Tubulussystem durch die glomeruläre Filtration wäre dessen Konzentration nur abhängig von der Konzentration im Blut und nicht von der Geometrie des Tubulus⁽⁷⁷⁾. Als Ort der Produktion des Liganden bieten sich beispielsweise die Podozyten an⁽⁷⁷⁾. Vor dem Hintergrund der vorliegenden Experimente wäre aber auch eine Sezernierung weiter distal vorstellbar, da durchaus die Möglichkeit besteht, dass der Regelkreis in verschiedenen Nephronabschnitten unterschiedlich gestaltet ist.

Bei einem größeren Tubulus wäre, bei einer konstanten Sezernierungsrate des Liganden, das zu füllende Volumen erstmal größer, so dass die Konzentration sinken würde⁽⁷⁷⁾. Allerdings

liegt in der Niere kein statisches, sondern ein dynamisches System vor, bei dem der Inhalt der Tubuli beständig erneuert wird. Die Flussrate in diesem System wird definiert durch die GFR und laut dem Kontinuitätsgesetz⁽¹⁵⁶⁾ ist diese in einem zusammenhängenden System überall identisch. Dies bedeutet, dass bei konstanter GFR bei einem großen Tubulus die Strömungsgeschwindigkeit langsamer wird und so der Volumenstrom genauso groß bleibt, wie bei einem kleineren Tubulus (Das Volumen V pro Zeit Δt ist dementsprechend konstant). Bei einer konstanten Sezernierungsrate des Liganden mit einer bestimmten Stoffmenge n pro Zeit Δt wäre demnach das Volumen, in das diese Stoffmenge sezerniert wird (unabhängig von der Tubulusgröße) gleich und somit auch die Konzentration konstant, was für einen Regelkreis ungünstig wäre:

$$V/\Delta t = \textit{konstant}$$

$$n/\Delta t = \textit{konstant}$$

$$\frac{n/\Delta t}{V/\Delta t} = \frac{n}{V} = c = \textit{konstant}$$

Allerdings hat das Modell, dass der Ligand erst im Nephronsystem sezerniert wird, einen deutlichen Vorteil. Man hat die beiden Stellschrauben „GFR“ und „Sezernierungsrate“, von denen man sich vorstellen kann, dass sie sich bei veränderter Tubulusgeometrie ändern könnten. Möglich wäre beispielsweise, dass bei einem größeren Tubulus, bedingt durch den schnelleren „Abfluss“ aus der Bowman-Kapsel, der Druck in dieser sinkt, was zu einer vermehrten Filtration, also steigender GFR führen würde.

Folglich könnte entgegen obiger Überlegungen trotzdem mehr Volumen pro Zeit (in welches der Ligand sezerniert wird) den Tubulus passieren, die Konzentration würde somit sinken. Bei vermehrter Filtration würde aber mehr Volumenfluss und erhöhte Stoffmengen an NaCl an der Macula Densa erscheinen, was, bedingt durch den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus, zu einer Vasokonstriktion des Vas afferens führen würde, wodurch die GFR wieder sinken würde⁽¹⁵⁷⁻¹⁵⁹⁾. Möglich, dass der tubuloglomeruläre Feedback-Mechanismus nicht sofort bei geringer GFR-Erhöhung aktiv wird⁽¹⁶⁰⁾, auf jeden Fall ergibt sich dadurch aber eine Untergrenze für die Konzentration des Liganden (bedingt durch eine Obergrenze der GFR).

Vorstellbar ist auch, dass es durch diese Vasokonstriktion zu einer verminderten Markausschwemmung kommt, wodurch der osmotische Gradient steigt und vermehrt Wasser resorbiert wird. Würde der Ligand im Tubulus nicht resorbiert werden, käme es auf diesem

Weg zu einem Konzentrationsanstieg. Das Problem aber, wenn der Ligand nicht äquivalent zu Wasser resorbiert wird, besteht einerseits darin, dass seine Konzentration im Laufe des Nephrons beständig ansteigen würde⁽⁷⁷⁾, und andererseits die Konzentration auch abhängig vom Wasserhaushalt, der Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems und anderen Einflussfaktoren wäre, was für eine einheitliche Regulation der Tubulusgröße ungeeignet wäre. Von daher ist dieser Ansatz vermutlich nicht zielführend.

Wenn man aber die GFR, u.a. durch den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus, als konstant betrachtet, so ergibt sich eine weitere Möglichkeit der Regulation, wenn man davon ausgeht, dass der Ligand nicht in der Bowman-Kapsel sondern weiter distal in den Tubulus gelangt (beispielsweise am Beginn des proximalen Tubulus). Wie bereits besprochen ist dies durchaus möglich, da in den proximalen Abschnitten andere Regulationsmechanismen vorliegen könnten. Durch eine Zunahme des Tubulusumfangs ständen dann auch mehr Zellen zur Verfügung, die den Liganden produzieren und sezernieren könnten, was bei konstanter GFR zu einer Konzentrationserhöhung führen würde.

Ein anderer Ansatz wäre, Mechanosensation mit Chemosensation zu kombinieren. Auch wenn nach Delling et al. das primäre Zilium keinen Mechnosensor darstellt, so führen trotzdem apikale mechanische Stimuli zu einem Ca^{2+} -Einstrom von basolateral⁽¹⁵⁰⁻¹⁵⁴⁾. Des Weiteren wird beschrieben, dass die Länge des primären Ziliums bei geringer intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration steigt und bei hoher Ca^{2+} -Konzentration abnimmt (u.a. wurde dies beobachtet bei renalen Sammelrohrzellen)⁽¹⁶¹⁾. Unterstützt werden diese Erkenntnisse durch Ergebnisse des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie des Instituts für Anatomie der Universität Regensburg, wonach bei den p/p-Mäusen die primären Zilien länger sind als bei den Wildtyp-Mäusen. Unter Umständen ist dies bedingt durch die schlechtere Leitfähigkeit von Polycystin-2(mPoreL1), welches bekanntermaßen bei der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum mitwirkt. Von daher ist es vorstellbar, dass bei einem kleinen Tubulusdurchmesser aufgrund der schnellen Strömungs-geschwindigkeit relativ große Kräfte wirken und durch diesen apikalen mechanischen Stimulus die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt, das Primäre Zilium wäre dann relativ kurz. Somit würde weniger Platz für den PC-1/PC-2-Komplex in der Membran des Primären Ziliums sein und damit auch weniger Rezeptoren für den Liganden zur Verfügung stehen. Bei größerem Tubulus würde umgekehrt das Zilium länger werden und die Anzahl an PC-1 im Zilium zunehmen. Auf diesem Weg könnte die Chemosensation in Abhängigkeit von der Tubulusgeometrie gesteuert werden.

Generell sind also mehrere Erklärungsansätze möglich, wobei das Problem ist, dass diese Ansätze teilweise nicht synergistisch sind. Bei einer sinkenden Konzentration (bei steigender Tubulusgröße) müsste der Ligand hemmend auf Polycystin-1 wirken, um einen sinnvollen Regelkreis konstruieren zu können. Bei Ansätzen mit steigender Konzentration (bei steigender Tubulusgröße) wäre hingegen eine Aktivierung von Polycystin-1 durch den Liganden eine notwendige Voraussetzung.

Das wahrscheinlichste Szenario ist eine Kombination aus den letzten beiden Ansätzen: Bei einem engen Tubulus produzieren relativ wenig Zellen den Liganden, die Konzentration im Harn ist gering. Zusätzlich führt der verhältnismäßig schnelle Fluss durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu kürzeren Zilien, was in einer verminderten Anzahl von Polycystin-1 und Polycystin-2 resultiert. Folglich wird Polycystin-1 durch den Liganden vermindert aktiviert, was zu einer verringerten Kanal-Aktivität von Polycystin-2 führt, bedingt durch eine Kombination aus weniger Polycystin-1-Aktivität und weniger Kanälen im primären Zilium. Durch den geringen Ca^{2+} -Strom kommt es zur Enthemmung eines Wachstumssignals, welches vermutlich im primären Zilium lokalisiert ist, wodurch der Tubulus an Größe zunimmt. Eine Lokalisierung des Wachstumssignals im primären Zilium ist dabei wahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration im primären Zilium nicht auf das Zytoplasma übertragen werden⁽¹⁶²⁾.

Mit steigender Größe stehen mehr Zellen zur Verfügung, welche den Liganden sezernieren können. Zusätzlich nimmt, bedingt durch den langsameren Fluss die Länge des primären Ziliums zu und die Anzahl an Rezeptoren und Kanälen steigt. Daher strömt vermehrt Ca^{2+} ins primäre Zilium und es kommt zur Hemmung des Wachstums, wodurch die Größe des Tubulus ab einem gewissen Wert konstant gehalten wird.

Die Tatsache aber, dass eine Zystenbildung, wenn auch deutlich langsamer, auch nach Verlust des primären Ziliums stattfindet⁽⁷⁶⁾, legt nahe, dass es unter Umständen noch weitere Mechanismen gibt, welche die Größe des Lumens beeinflussen können.

Auf dem Gebiet der Regulation der Tubulusgröße bleibt also noch Vieles ungewiss. Selbst wenn diese Arbeit hoffentlich dazu beitragen kann, weitere Erkenntnisse zu gewinnen so sind eindeutig noch zusätzliche Experimente notwendig. Um weitere Evidenz für das Vorhandensein eines Regelkreises und Einblicke in dessen Mechanismen zu erhalten, wäre es beispielsweise interessant, die Tubulusgröße auch bei +/p- und +/--Mäusen zu bestimmen und mit denen der +/+ und p/p-Mäusen zu vergleichen. Auch GFR-Messungen bei den

Knock-In-Mäusen könnten hilfreich sein, die Mechanismen des Regelkreises weiter zu beleuchten. Letztendlich stellt sich auch die Frage, was den Liganden zu Polycystin-1 darstellt und wo genau im Nephron seine Produktion oder Sezernierung stattfindet.

5. Zusammenfassung

Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist eine Erkrankung, die sich, neben einer Reihe extrarenaler Manifestationen, vor allem durch die massive Ausbildung bilateraler Nierenzysten äußert, welche zur konsekutiven Verschlechterung der Nierenfunktion und zur Verdrängung benachbarter Strukturen führt. Im 60. Lebensjahr leiden 50% der Patienten an einer terminalen Niereninsuffizienz.

Auslösend für die ADPKD sind inaktivierende Mutationen in den Genen *PKD1* oder *PKD2*, was zum Fehlen oder zur fehlerhaften Translation der Genprodukte Polycystin-1 und Polycystin-2 führt.

Bei Polycystin-1 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, dem u.a. die Funktion eines Chemo- oder Mechanosensors zugesprochen wird. Polycystin-2 ist ein unselektiver Kationenkanal mit hoher Leitfähigkeit für Ca^{2+} , welcher im endoplasmatischen Retikulum und, als Komplex mit Polycystin-1, im primären Zilium lokalisiert ist.

Es gibt Theorien, dass durch den Ca^{2+} -Einstrom, der durch den Polycystin-1/2-Komplex im primären Zilium vermittelt wird, die Größe des Tubuluslumens reguliert wird. Um diese Theorie weiter zu untersuchen, wurden Knock-In-Mäuse erzeugt, welche eine mutierte Form von Polycystin-2 exprimierten, genannt Polycystin-2(mPoreL1). Bei Polycystin-2(mPoreL1) handelt es sich um Polycystin-2 mit einer Porenregion die gegen die Porenregion von Polycystin-2L1 ausgetauscht wurde. Polycystin-2L1 ist ein Protein mit großer Sequenzähnlichkeit zu Polycystin-2, welches ebenfalls als nichtselektiver Kationenkanal fungiert. Diese Mutation wurde auf zwei genetischen Hintergründen getestet: C57Bl/6 und 129/Sv.

Im Zuge dieser Arbeit konnte mittels PCR und Western Blot gezeigt werden, dass die Knock-In-Mäuse bei beiden genetischen Hintergründen sowohl mRNA als auch Protein des mutierten Allels exprimieren, allerdings beides in einer verminderten Menge. Des Weiteren konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass Polycystin-2(mPoreL1) auf die gleiche Weise intrazellulär lokalisiert wie Polycystin-2.

Von den homozygoten Knock-In-Mäusen mit 129/Sv-Hintergrund war bereits bekannt, dass sie bilateral renale Zysten entwickelten. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit verschiedenen Antikörpern, welche jeweils für bestimmte Nephronabschnitte spezifisch sind, konnte

nachgewiesen werden, dass die Zysten dieser Mauslinie alle das Sammelrohr als Ursprung haben.

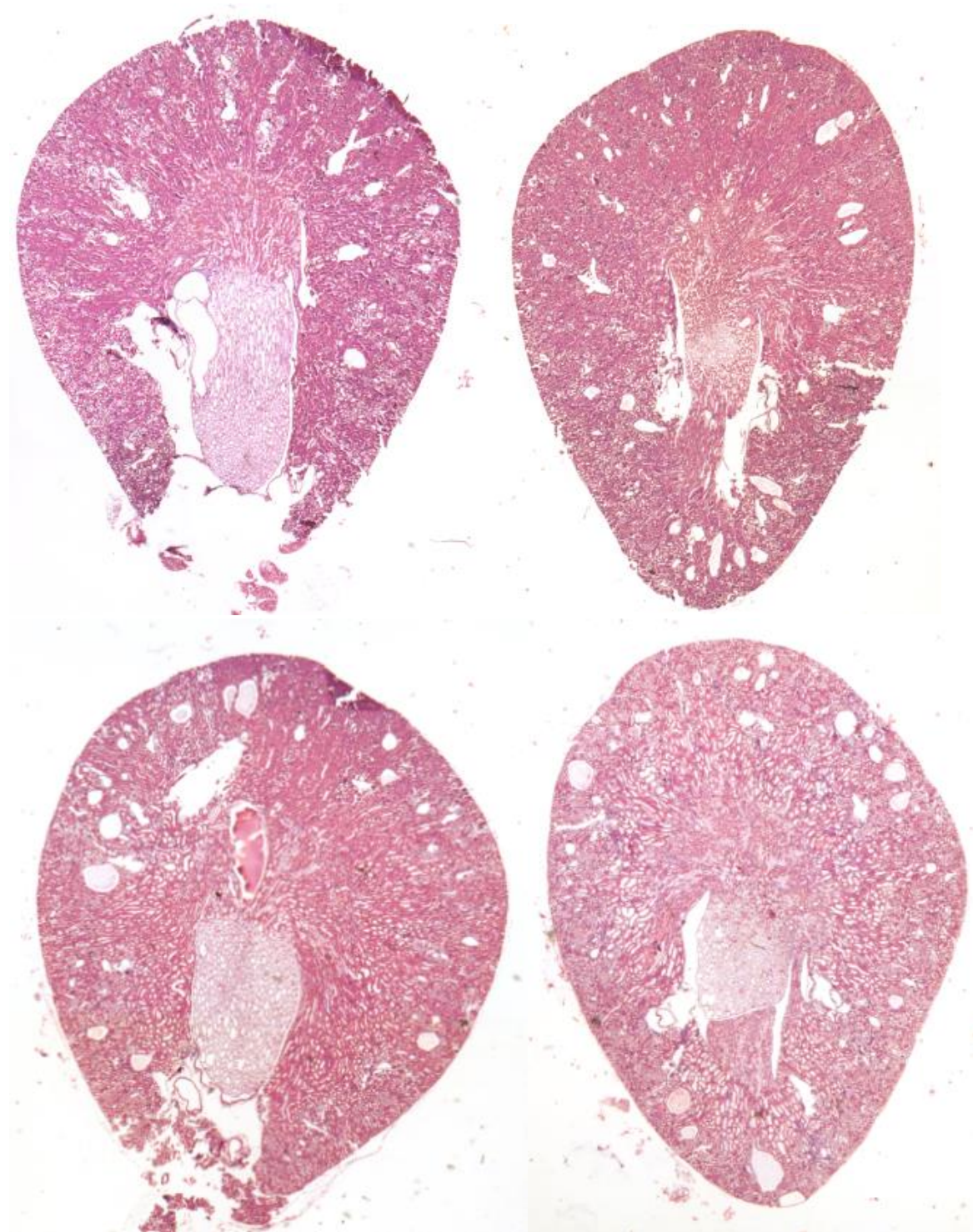
Des Weiteren wurden die Lumen-Größen von Tubulusquerschnitten zwischen Wildtyp-Mäusen und homozygoten Knock-In-Mäusen verglichen. Hierzu wurden Paraffinschnitte mit einem Nephronsegmentmarker für den distalen Tubulus, Pars recta, bzw. für das Sammelrohr gefärbt und die Fläche der Lumina der angefärbten Tubuli mittels ImageJ bestimmt. Hier zeigte sich, dass die Flächeninhalte bei den Sammelrohren beim 129/Sv-Hintergrund bei den Knock-In-Mäusen signifikant größer sind als bei den Wildtyp-Mäusen. Auch die distalen Tubuli sind bei den Knock-In-Mäusen mit diesem genetischen Hintergrund tendenziell größer, der Unterschied ist aber deutlich geringer und nicht statistisch signifikant. Bei der Auswertung der Sammelrohre der C57Bl/6-Mäusen hingegen war ebenfalls ein signifikanter Größenunterschied zu beobachten.

Abschließend wurden Expressionsplasmide kloniert, welche das humane Gen von Polycystin-2 trugen, wobei bei einem Teil der Plasmide die Porenregion hin zur Porenregion des (humanen) Polycystin-2L1 verändert wurde. Das Genprodukt mit dieser veränderten Porenregion wurde Polycystin-2(hPoreL1) genannt. An Polycystin-2 bzw. Polycystin-2(hPoreL1) wurde der Ca^{2+} -Indikator GCaMP6s gekoppelt, um mittels dessen Fluoreszenzänderung die Ca^{2+} -Leitfähigkeit von Polycystin-2 und Polycystin-2(hPoreL1) vergleichen zu können. Die Plasmide wurden in LLC-PK₁-Zellen transfiziert, welche mit Vasopressin und ATP stimuliert wurden, um eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum auszulösen. Die Auswertung zeigte, dass bei einer Position des GCaMP6s am C-Terminus von Polycystin-2 die Zellen, die mit dem Wildtyp transfiziert waren, in der Regel einen stärkeren Fluoreszenzanstieg hatten. Bei einer Position von GCaMP6s am N-Terminus hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Allerdings war bei letzterer Anordnung der Fluoreszenzanstieg generell geringer.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei den Knock-In-Mäusen ein (teilweise) funktionstüchtiges Protein vorliegt und zusätzlich vermutlich eine verringerte Ca^{2+} -Leitfähigkeit besteht (bedingt durch eine geringere Anzahl an Kanälen in Kombination mit einer unter Umständen verringerten Leitfähigkeit des einzelnen Kanals). Die Tatsache, dass die Mutation zu einer signifikanten Vergrößerung der Sammelrohre führt spricht dafür, dass zumindest in den Sammelrohren ein Regelkreis zur Definition der Tubulusgröße existiert, welcher Polycystin-2 involviert.

6. Anhang

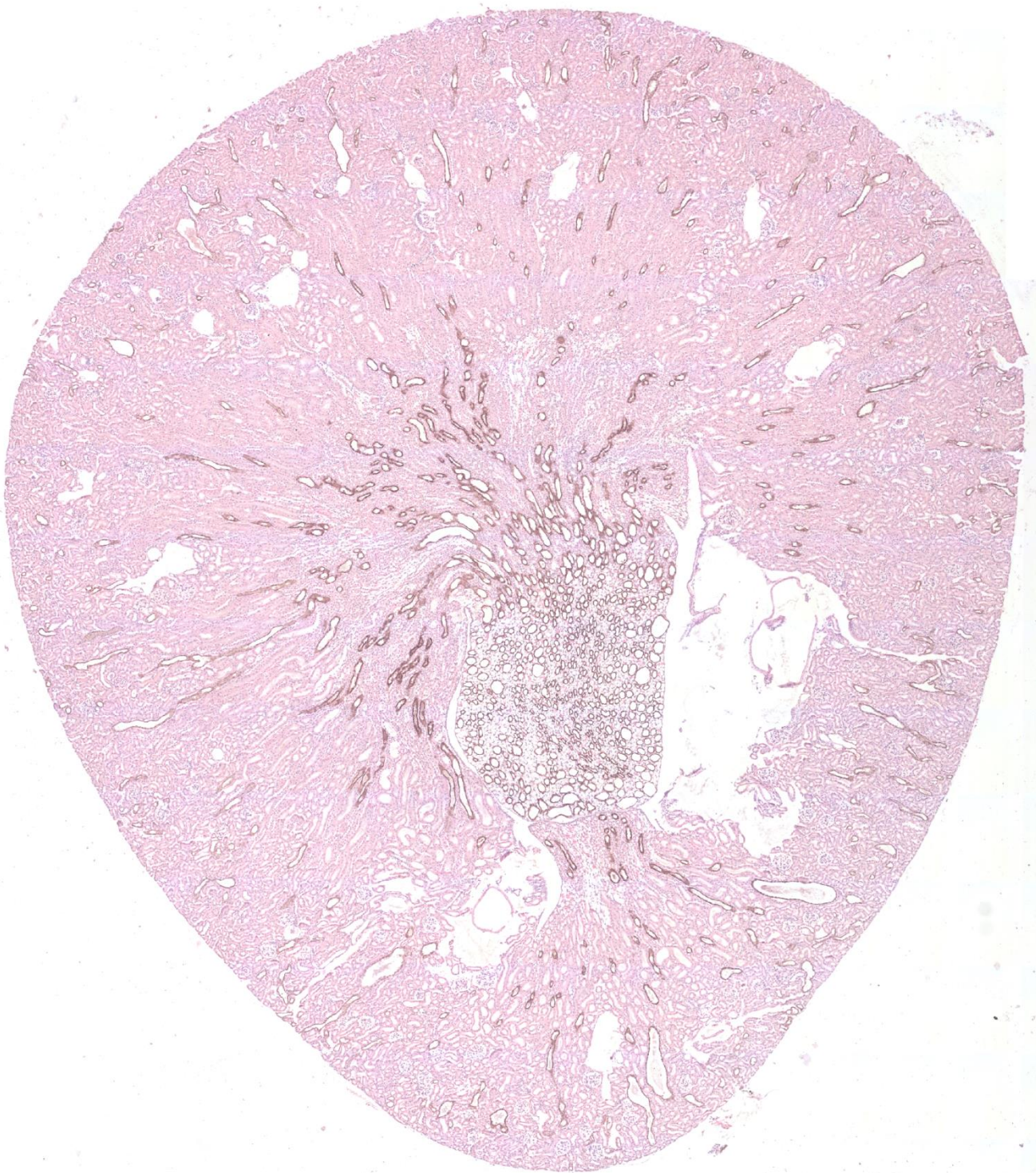
6.1. HE-Färbungen von Nieren homozygoter Knock-In-Mäuse auf 129/Sv-Hintergrund



6.2. DAB-Färbung von Nieren homozygoter Knock-In-Mäuse auf 129/Sv-Hintergrund
6.2.1. 3 Monate altes Tier



6.2.2. 6 Monate altes Tier



6.2.3. 9 Monate altes Tier



6.2.4. 12 Monate altes Tier



6.3. Statistische Auswertung der Bestimmung der Tubulusquerschnittsfläche

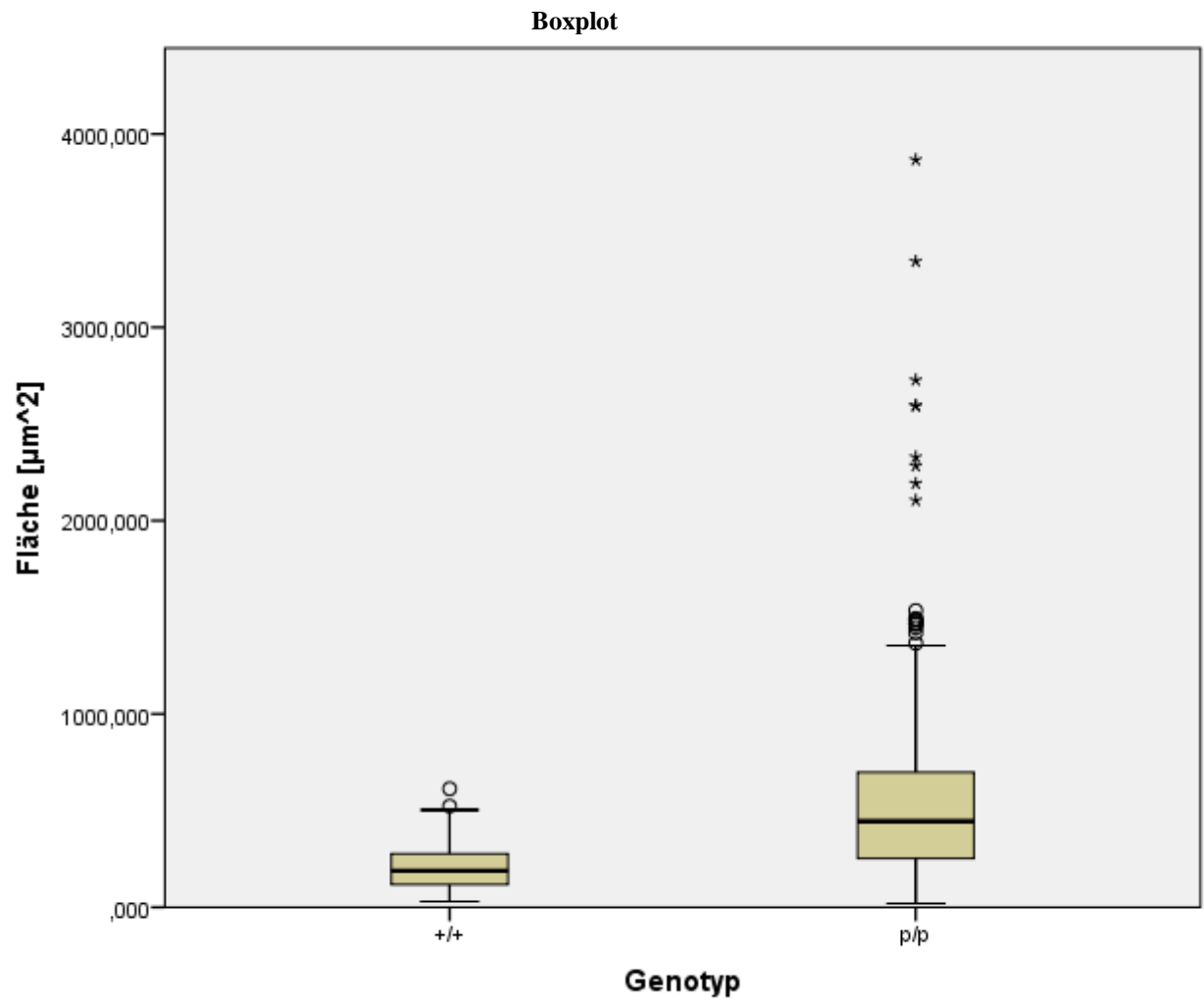
6.3.1. Auswertung der Sammelrohre mit 129/Sv-Hintergrund

Deskriptive Statistik

Genotyp			Statistik	Standardfehler
Fläche [μm^2]	+/+	Mittelwert	202,40985	6,828510
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
			188,96137 215,85833	
		5% getrimmtes Mittel	196,36000	
		Median	189,36650	
		Varianz	11750,395	
		Standardabweichung	108,399238	
		Minimum	30,544	
		Maximum	613,120	
		Spannweite	582,576	
		Interquartilbereich	160,285	
		Schiefe	,803	,153
		Kurtosis	,378	,306
	p/p	Mittelwert	577,18710	31,522726
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
			515,12858 639,24563	
		5% getrimmtes Mittel	511,02719	
		Median	444,54150	
		Varianz	272268,931	
		Standardabweichung	521,793954	
		Minimum	20,031	
		Maximum	3866,763	
		Spannweite	3846,732	
		Interquartilbereich	446,809	
		Schiefe	2,769	,147
		Kurtosis	10,684	,293

Perzentile

Genotyp			Perzentile						
			5	10	25	50	75	90	95
Gewichtetes Mittel (Definition 1)	Fläche	+/+	62,952	79,758	117,408	189,367	277,693	353,250	405,978
	[μm^2]	p/p	104,504	155,275	252,024	444,542	698,833	1176,500	1473,161
Tukey- Angelpunkte	Fläche	+/+			117,859	189,367	276,935		
	[μm^2]	p/p			252,316	444,542	697,632		



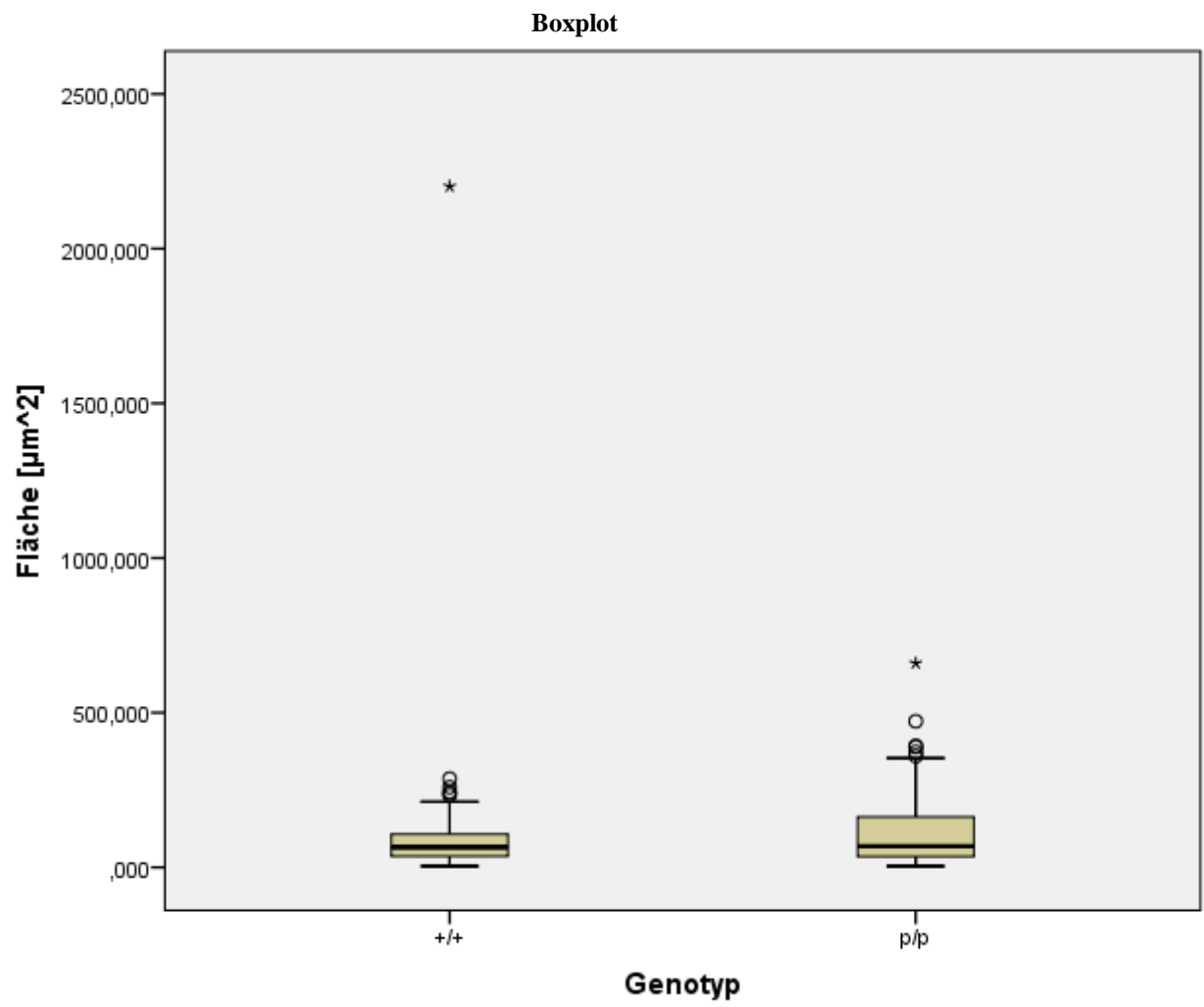
6.3.2. Statistische Auswertung der distalen Tubuli, Pars recta, mit 129/Sv-Hintergrund

Deskriptive Statistik

Genotyp			Statistik	Standardfehler
Fläche [μm^2]	+/+	Mittelwert	89,97103	12,308095
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	65,68612 114,25593
		5% getrimmtes Mittel	74,31697	
		Median	65,50800	
		Varianz	27722,523	
		Standardabweichung	166,500820	
		Minimum	3,628	
		Maximum	2201,372	
		Spannweite	2197,744	
		Interquartilbereich	71,615	
		Schiefe	11,352	,180
		Kurtosis	143,843	,357
	p/p	Mittelwert	113,92442	7,938119
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	98,26298 129,58586
		5% getrimmtes Mittel	103,45290	
		Median	68,59487	
		Varianz	11657,542	
		Standardabweichung	107,970096	
		Minimum	3,628	
		Maximum	660,088	
		Spannweite	656,460	
		Interquartilbereich	130,715	
		Schiefe	1,638	,179
		Kurtosis	3,496	,355

Perzentile

Genotyp			Perzentile						
			5	10	25	50	75	90	95
Gewichtetes Mittel (Definition 1)	Fläche	+/+	15,586	21,907	35,390	65,508	107,005	157,803	205,746
	[μm^2]	p/p	9,960	17,779	34,203	68,595	164,918	284,403	342,611
Tukey-Angelpunkte	Fläche	+/+			35,455	65,508	106,979		
	[μm^2]	p/p			34,842	68,595	162,986		



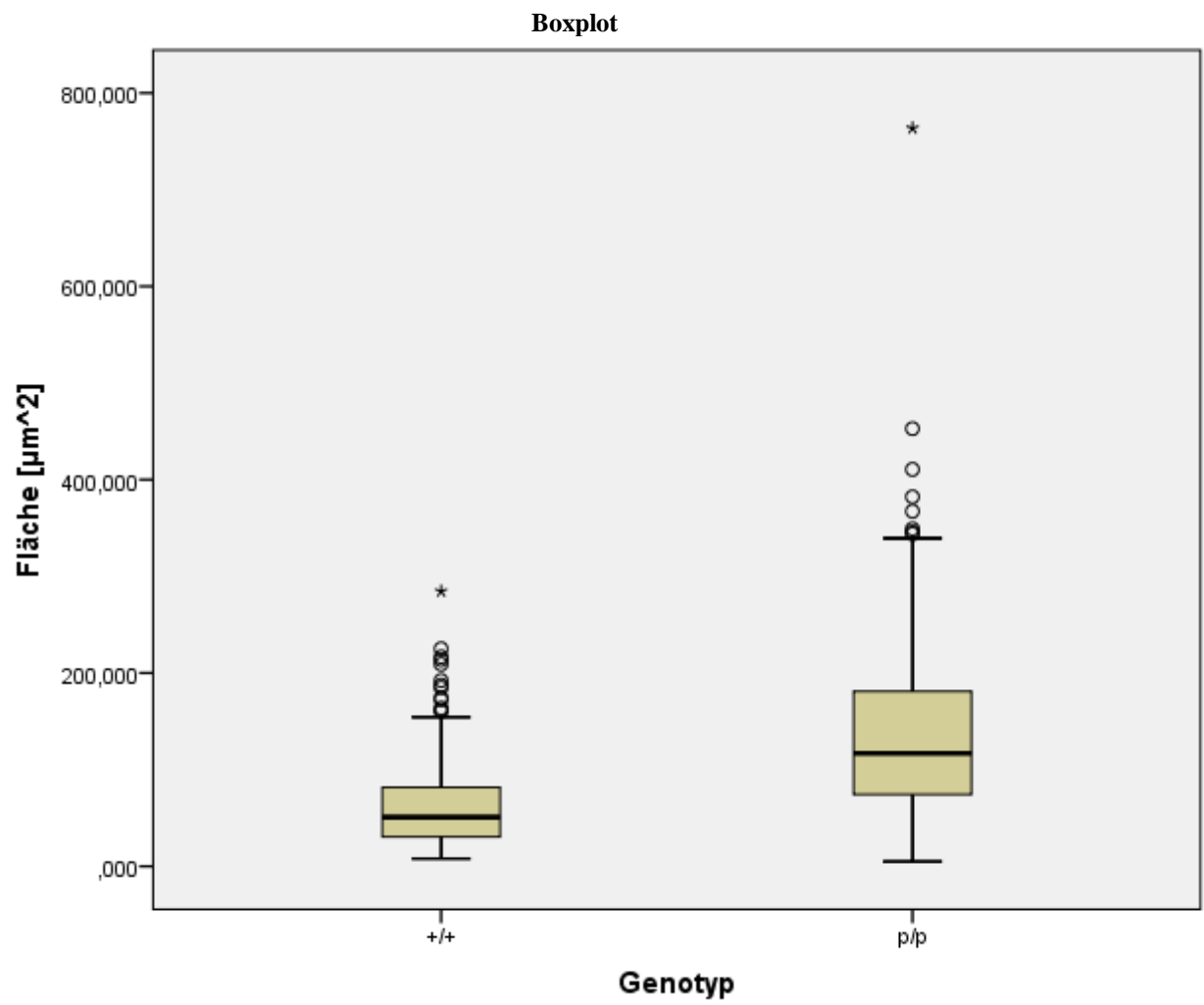
6.3.3. Statistische Auswertung der Sammelrohre mit C57Bl/6-Hintergrund

Deskriptive Statistik

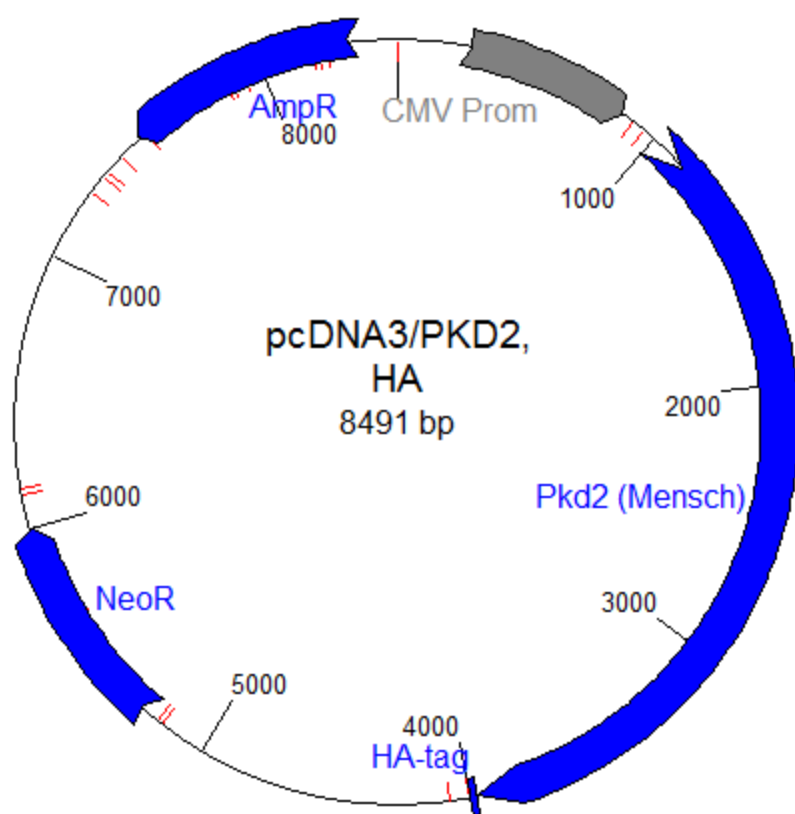
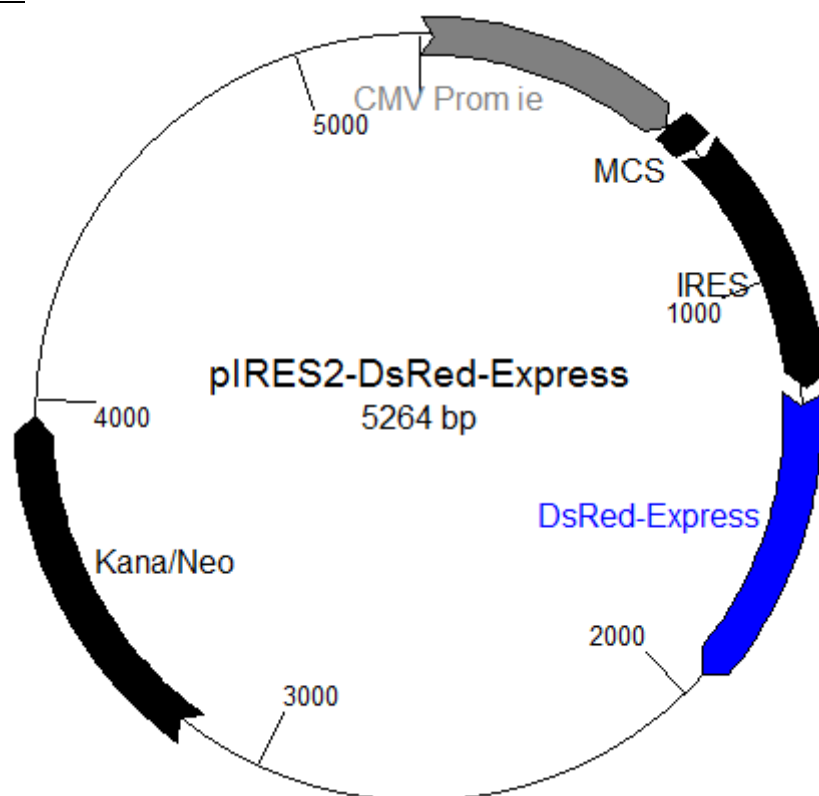
Genotyp			Statistik	Standardfehler
Fläche [μm^2]	+/+	Mittelwert	64,06693	2,970389
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	58,21582 69,91805
		5% getrimmtes Mittel	59,49472	
		Median	50,83900	
		Varianz	2144,041	
		Standardabweichung	46,303789	
		Minimum	7,755	
		Maximum	284,655	
		Spannweite	276,900	
		Interquartilbereich	51,830	
		Schiefe	1,589	,156
		Kurtosis	2,999	,311
p/p	p/p	Mittelwert	136,55858	4,997484
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	126,72591 146,39124
		5% getrimmtes Mittel	129,79477	
		Median	116,95100	
		Varianz	7892,051	
		Standardabweichung	88,837215	
		Minimum	4,998	
		Maximum	763,747	
		Spannweite	758,749	
		Interquartilbereich	106,644	
		Schiefe	1,796	,137
		Kurtosis	7,677	,273

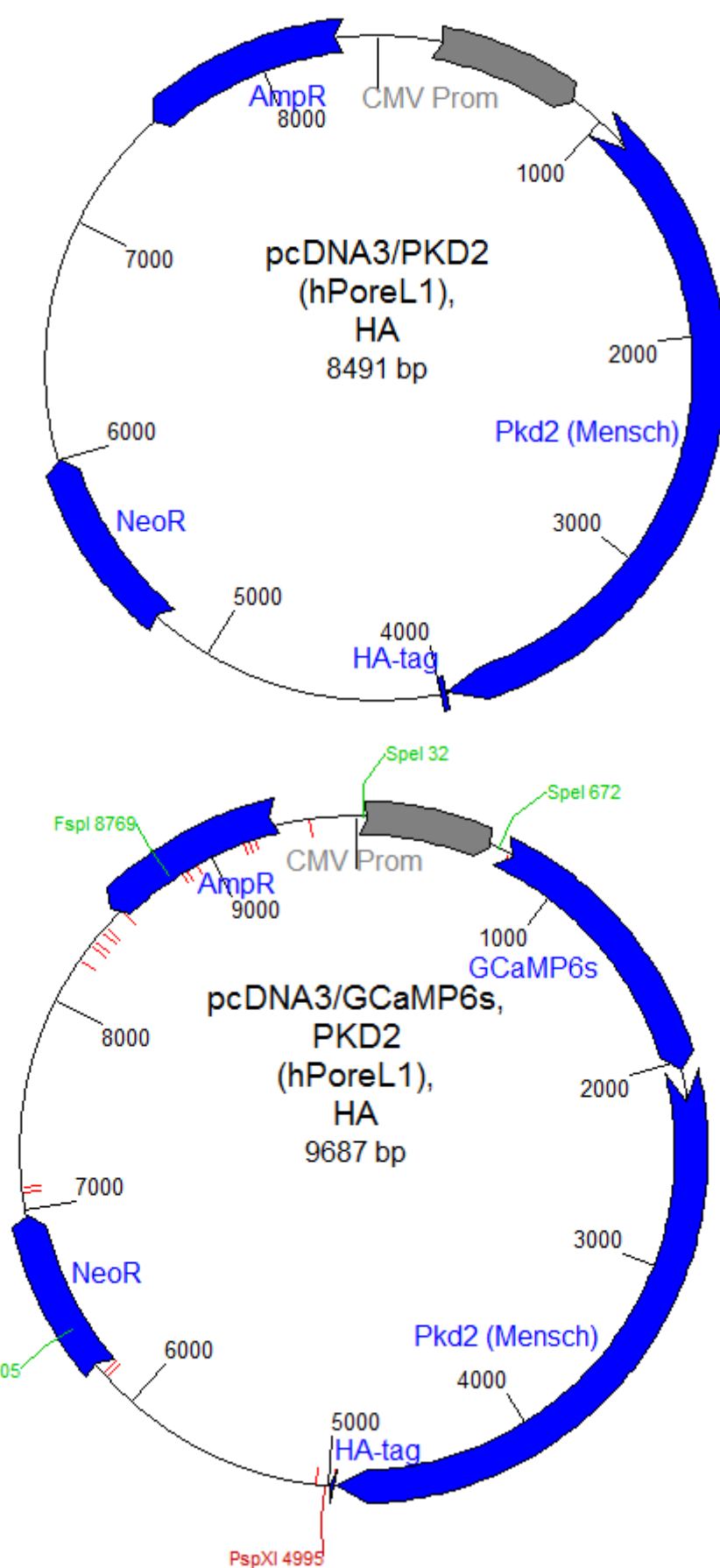
Perzentile

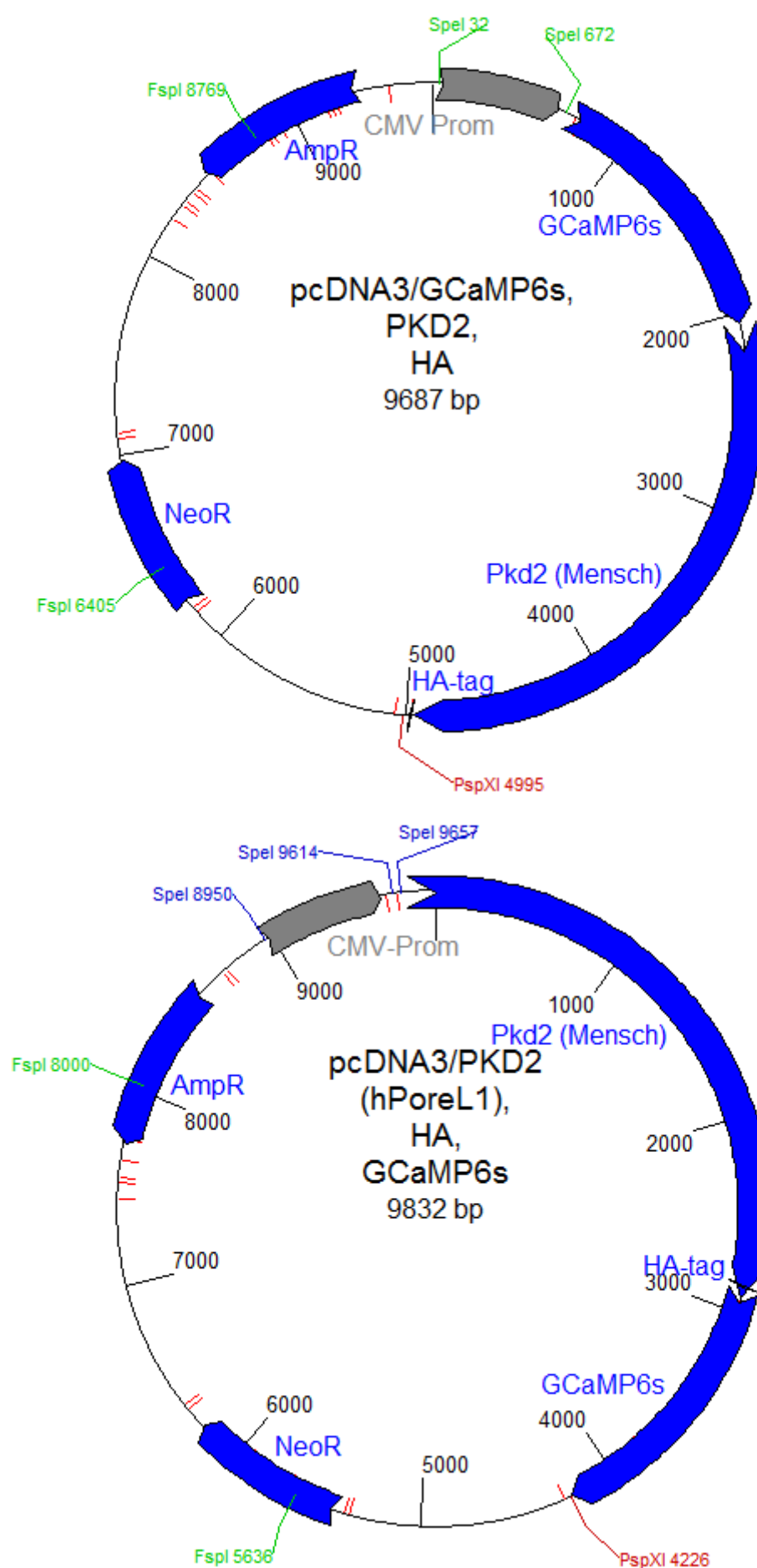
Genotyp			Perzentile						
			5	10	25	50	75	90	95
Gewichtetes Mittel (Definition 1)	Fläche	+/+	15,330	21,559	30,159	50,839	81,989	127,508	161,074
	[μm^2]	p/p	30,036	42,502	74,341	116,951	180,984	246,651	294,922
Tukey-Angelpunkte	Fläche	+/+			30,418	50,839	81,731		
	[μm^2]	p/p			74,449	116,951	180,931		

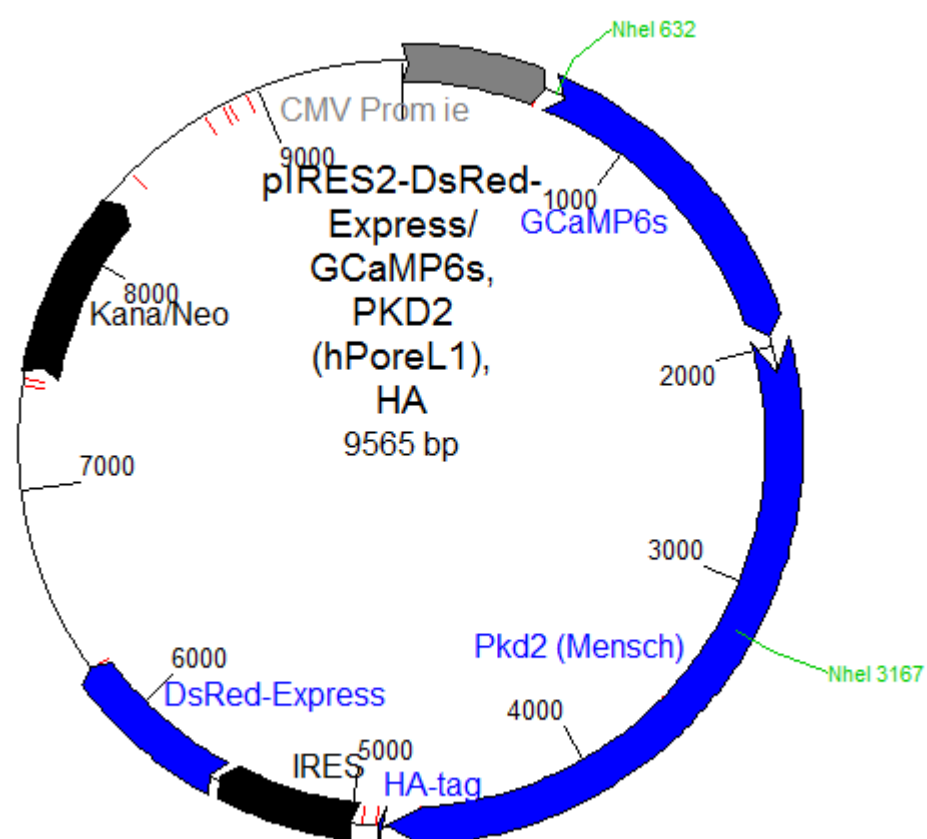
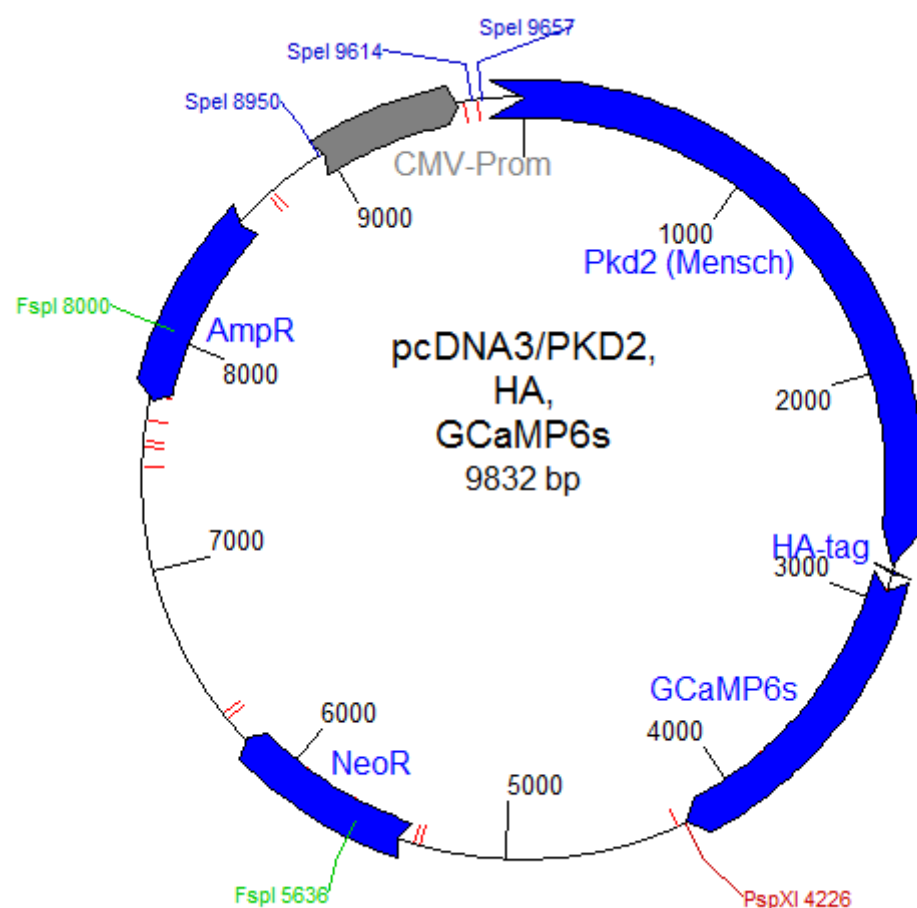


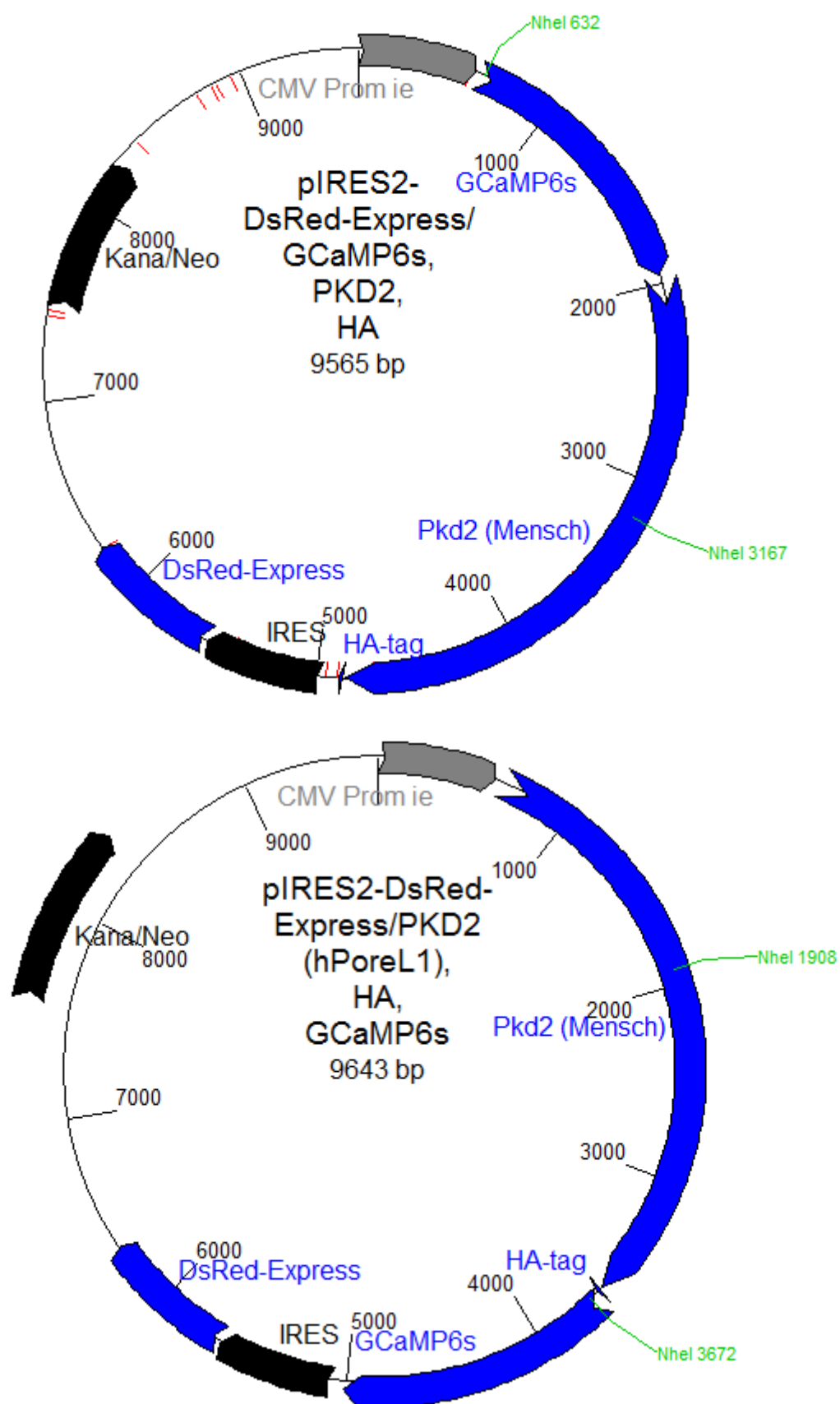
6.4. Plasmidkarten

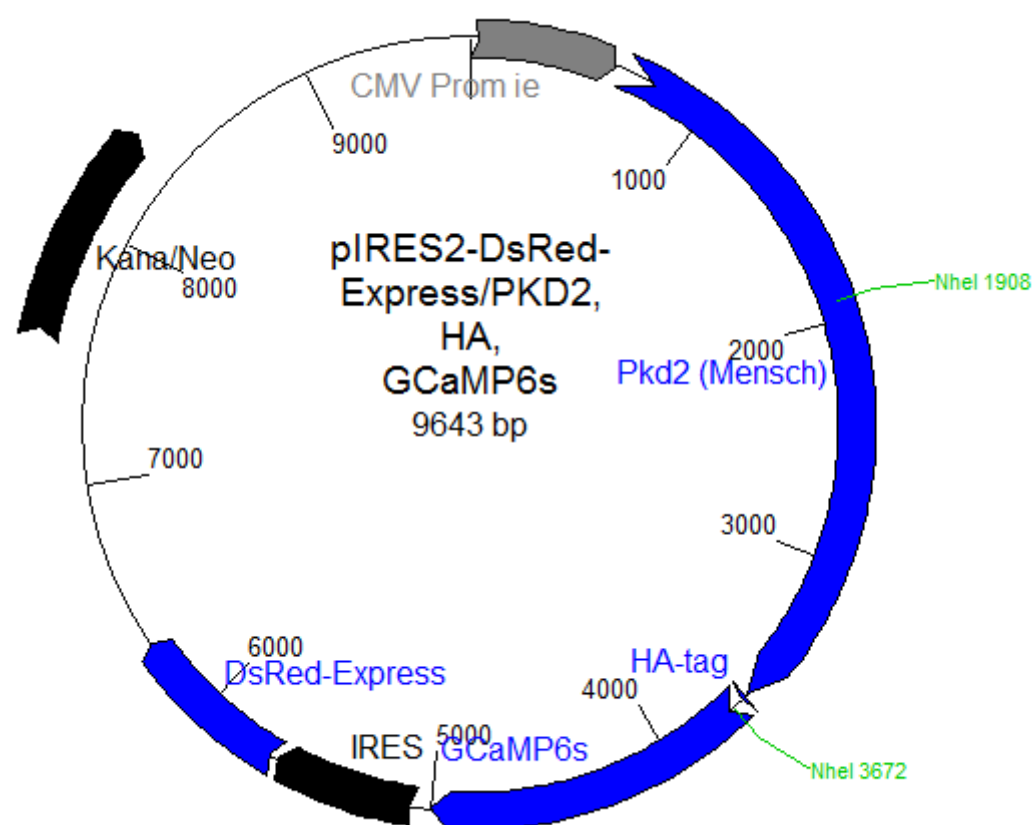












7. Literaturverzeichnis

1. Srivastava A, Patel N. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am Fam Physician*. 2014;90(5):303–7.
2. Harris PC, Torres VE. Polycystic Kidney Disease, Autosomal Dominant. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, u. a., Herausgeber. *GeneReviews(®)* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [zitiert 22. Juli 2016]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1246/>
3. Igarashi P, Somlo S, Editor F. Genetics and Pathogenesis of Polycystic Kidney Disease. *JASN*. 2002;13(9):2384–98.
4. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB, Guay-Woodford LM, Bae KT, King BF, u. a. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2006;354(20):2122–30.
5. Paul BM, Vanden Heuvel GB. Kidney: polycystic kidney disease. *WIREs Dev Biol*. 2014;3(6):465–87.
6. Ong ACM, Harris PC. Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex. *Kidney Int*. 2005;67(4):1234–47.
7. Torra R, Badenas C, Darnell A, Nicolau C, Volpini V, Revert L, et al. Linkage, clinical features, and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2. *JASN*. 1996;7(10):2142–51.
8. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, Torres VE, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, et al. Comprehensive Molecular Diagnostics in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN*. 2007;18(7):2143–60.
9. Nims N, Vassmer D, Maser RL. Transmembrane Domain Analysis of Polycystin-1, the Product of the Polycystic Kidney Disease-1 (PKD1) Gene: Evidence for 11 Membrane-Spanning Domains†. *Biochemistry*. 2003;42(44):13035–48.
10. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, et al. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet*. 1995;10(2):151–60.
11. Sandford R, Sgotto B, Aparicio S, Brenner S, Vaudin M, Wilson RK, et al. Comparative Analysis of the Polycystic Kidney Disease 1 (PKD1) Gene Reveals an Integral Membrane Glycoprotein with Multiple Evolutionary Conserved Domains. *Hum Mol Genet*. 1997;6(9):1483–9.
12. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*. 1996;272(5266):1339–42.
13. Cai Y, Maeda Y, Cedzich A, Torres VE, Wu G, Hayashi T, et al. Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28557–65.
14. Neumann HPH, Jilg C, Bacher J, Nabulsi Z, Malinoc A, Hummel B, u. a. Epidemiology of autosomal-dominant polycystic kidney disease: an in-depth clinical study for south-western Germany. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(6):1472–87.
15. Davies F, Coles G, Harper P, Williams A, Evans C, Cochlin D. Polycystic Kidney Disease Re-evaluated: A Population-based Study. *QJM*. 1991;79(3):477–85.
16. Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, Holley KE, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935–1980. *Am J Kidney Dis*. 1983;2(6):630–9.

17. Stengel B, Billon S, Dijk PCW van, Jager KJ, Dekker FW, Simpson K, u. a. Trends in the incidence of renal replacement therapy for end-stage renal disease in Europe, 1990–1999. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(9):1824–33.
18. Wakai K, Nakai S, Kikuchi K, Iseki K, Miwa N, Masakane I, u. a. Trends in incidence of end-stage renal disease in Japan, 1983–2000: age-adjusted and age-specific rates by gender and cause. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(8):2044–52.
19. Gallagher AR, Hidaka S, Gretz N, Witzgall R. Molecular basis of autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(4):682–93.
20. Spithoven EM, Kramer A, Meijer E, Orskov B, Wanner C, Abad JM, u. a. Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: prevalence and survival--an analysis of data from the ERA-EDTA Registry. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29 Suppl 4:iv15-25.
21. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(10):556–66.
22. Johnson AM, Gabow PA. Identification of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease at highest risk for end-stage renal disease. *JASN*. 1997;8(10):1560–7.
23. van den Dool SW, Wasser MN, de Fijter JW, Hoekstra J, van der Geest RJ. Functional renal volume: quantitative analysis at gadolinium-enhanced MR angiography--feasibility study in healthy potential kidney donors. *Radiology*. 2005;236(1):189–95.
24. Ekser B, Rigotti P. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(1):71–71.
25. Fick GM, Johnson AM, Hammond WS, Gabow PA. Causes of death in autosomal dominant polycystic kidney disease. *JASN*. 1995;5(12):2048–56.
26. Woo D. Apoptosis and Loss of Renal Tissue in Polycystic Kidney Diseases. *New England Journal of Medicine*. 1995;333(1):18–25.
27. Torres VE, King BF, Chapman AB, Brummer ME, Bae KT, Glockner JF, u. a. Magnetic Resonance Measurements of Renal Blood Flow and Disease Progression in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *CJASN*. 2007;2(1):112–20.
28. Bennett WM. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: 2009 Update for Internists. *Korean J Intern Med*. 2009;24(3):165–8.
29. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int*. 2009;76(2):149–68.
30. Bajwa ZH, Sial KA, Malik AB, Steinman TI. Pain patterns in patients with polycystic kidney disease. *Kidney Int*. 2004;66(4):1561–9.
31. Gibson P, Watson ML. Cyst infection in polycystic kidney disease: a clinical challenge. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(10):2455–7.
32. Schwab SJ, Bander SJ, Klahr S. Renal infection in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Med*. 1987;82(4):714–8.
33. Sallée M, Rafat C, Zahar J-R, Paulmier B, Grünfeld J-P, Knebelmann B, u. a. Cyst Infections in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(7):1183–9.
34. Torres VE, Wilson DM, Hattery RR, Segura JW. Renal stone disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 1993;22(4):513–9.
35. Pirson Y. Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010;17(2):173–80.
36. Roscoe JM, Brissenden JE, Williams EA, Chery AL, Silverman M. Autosomal dominant polycystic kidney disease in Toronto. *Kidney International*. 1993;44(5):1101–8.

37. Bae KT, Zhu F, Chapman AB, Torres VE, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, et al. Magnetic Resonance Imaging Evaluation of Hepatic Cysts in Early Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease: The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease Cohort. *CJASN*. 2006;1(1):64–9.
38. Xu HW, Yu SQ, Mei CL, Li MH. Screening for intracranial aneurysm in 355 patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Stroke*. 2011;42(1):204–6.
39. Pirson Y, Chauveau D, Torres V. Management of Cerebral Aneurysms in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN*. 2002;13(1):269–76.
40. Rozenfeld MN, Ansari SA, Shaibani A, Russell EJ, Mohan P, Hurley MC. Should Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Be Screened for Cerebral Aneurysms? *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35(1):3–9.
41. Schrier RW. Optimal care of autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Nephrology (Carlton)*. 2006;11(2):124–30.
42. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The Molecular Basis of Focal Cyst Formation in Human Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Type I. *Cell*. 1996;87(6):979–87.
43. Chapin HC, Caplan MJ. The cell biology of polycystic kidney disease. *J Cell Biol*. 2010;191(4):701–10.
44. Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, et al. Somatic Inactivation of Pkd2 Results in Polycystic Kidney Disease. *Cell*. 1998;93(2):177–88.
45. Takakura A, Contrino L, Zhou X, Bonventre JV, Sun Y, Humphreys BD, et al. Renal injury is a third hit promoting rapid development of adult polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*. 2009;18(14):2523–31.
46. Takakura A, Contrino L, Beck AW, Zhou J. Pkd1 Inactivation Induced in Adulthood Produces Focal Cystic Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(12):2351–63.
47. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease: The complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell*. 1995;81(2):289–98.
48. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, Braeg S, Voelker H, Bredt S, et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1115–22.
49. Tanaka Y, Okada Y, Hirokawa N. FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature*. 2005;435(7039):172–7.
50. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*. 2003;33(2):129–37.
51. Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, et al. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol*. 2002;4(3):191–7.
52. González-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, et al. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(3):1182–7.
53. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, et al. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*. 2000;408(6815):990–4.
54. Vassilev PM, Guo L, Chen XZ, Segal Y, Peng JB, Basora N, et al. Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca²⁺ homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282(1):341–50.
55. Witzgall R. TRPP2 channel regulation. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(179):363–75.
56. Hoffmeister H, Gallagher A-R, Rascle A, Witzgall R. The human polycystin-2 protein represents an integral membrane protein with six membrane-spanning domains and

- intracellular N- and C-termini. *Biochem J.* 2011;433(2):285–94.
57. Feng S, Okenka GM, Bai C-X, Streets AJ, Newby LJ, DeChant BT, et al. Identification and Functional Characterization of an N-terminal Oligomerization Domain for Polycystin-2. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28471–9.
 58. Yang Y, Keeler C, Kuo IY, Lolis EJ, Ehrlich BE, Hodsdon ME. Oligomerization of the Polycystin-2 C-terminal Tail and Effects on Its Ca²⁺-binding Properties. *J Biol Chem.* 2015;290(16):10544–54.
 59. Yu Y, Ulbrich MH, Li M-H, Buraei Z, Chen X-Z, Ong ACM, et al. Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex. *PNAS.* 2009;106(28):11558–63.
 60. Zhu J, Yu Y, Ulbrich MH, Li M, Isacoff EY, Honig B, et al. Structural model of the TRPP2/PKD1 C-terminal coiled-coil complex produced by a combined computational and experimental approach. *PNAS.* 2011;108(25):10133–8.
 61. Petri ET, Celic A, Kennedy SD, Ehrlich BE, Boggon TJ, Hodsdon ME. Structure of the EF-hand domain of polycystin-2 suggests a mechanism for Ca²⁺-dependent regulation of polycystin-2 channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(20):9176–81.
 62. Schumann F, Hoffmeister H, Bader R, Schmidt M, Witzgall R, Kalbitzer HR. Ca²⁺-dependent conformational changes in a C-terminal cytosolic domain of polycystin-2. *J Biol Chem.* 2009;284(36):24372–83.
 63. Li Q, Montalbetti N, Shen PY, Dai X-Q, Cheeseman CI, Karpinski E, et al. Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Hum Mol Genet.* 2005;14(12):1587–603.
 64. Wang S, Zhang J, Nauli SM, Li X, Starremans PG, Luo Y, et al. Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Mol Cell Biol.* 2007;27(8):3241–52.
 65. Wu Y, Dai X-Q, Li Q, Chen CX, Mai W, Hussain Z, et al. Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet.* 2006;15(22):3280–92.
 66. Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet.* 1997;16(2):179–83.
 67. Lakkis M, Zhou J. Molecular complexes formed with polycystins. *Nephron Exp Nephrol.* 2003;93(1):e3–8.
 68. Witzgall R. Polycystin-2--an intracellular or plasma membrane channel? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005;371(4):342–7.
 69. Luo Y, Vassilev PM, Li X, Kawanabe Y, Zhou J. Native Polycystin 2 Functions as a Plasma Membrane Ca²⁺-Permeable Cation Channel in Renal Epithelia. *Mol Cell Biol.* 2003;23(7):2600–7.
 70. Scheffers MS, Le H, van der Bent P, Leonhard W, Prins F, Spruit L, et al. Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells. *Hum Mol Genet.* 2002;11(1):59–67.
 71. Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Current Biology.* 2002;12(11):R378–80.
 72. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(10):2508–16.
 73. Geng L, Okuhara D, Yu Z, Tian X, Cai Y, Shibasaki S, et al. Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 7):1383–95.
 74. Hoffmeister H, Babinger K, Gürster S, Cedzich A, Meese C, Schadendorf K, et al.

- Polycystin-2 takes different routes to the somatic and ciliary plasma membrane. *J Cell Biol.* 2011;192(4):631–45.
75. Obermüller N, Gallagher AR, Cai Y, Gassler N, Gretz N, Somlo S, u. a. The rat pkd2 protein assumes distinct subcellular distributions in different organs. *Am J Physiol.* 1999;277(6 Pt 2):F914-925.
 76. Ma M, Tian X, Igarashi P, Pazour GJ, Somlo S. Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet.* 2013;45(9):1004–12.
 77. Witzgall R. New developments in the field of cystic kidney diseases. *Curr Mol Med.* 2005;5(5):455–65.
 78. Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, Rankin CA, Smine A, Okamoto T, et al. The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251(2):625–31.
 79. Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, Zien CA, Frischauf A-M, Calvet JP. Polycystin-1 activation of c-Jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19566–72.
 80. Happé H, Leonhard WN, van der Wal A, van de Water B, Lantinga-van Leeuwen IS, Breuning MH, et al. Toxic tubular injury in kidneys from Pkd1-deletion mice accelerates cystogenesis accompanied by dysregulated planar cell polarity and canonical Wnt signaling pathways. *Hum Mol Genet.* 2009;18(14):2532–42.
 81. Kim I, Ding T, Fu Y, Li C, Cui L, Li A, et al. Conditional mutation of Pkd2 causes cystogenesis and upregulates beta-catenin. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(12):2556–69.
 82. Lal M, Song X, Pluznick JL, Di Giovanni V, Merrick DM, Rosenblum ND, et al. Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Hum Mol Genet.* 2008;17(20):3105–17.
 83. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu P-N, et al. PKD1 Induces p21waf1 and Regulation of the Cell Cycle via Direct Activation of the JAK-STAT Signaling Pathway in a Process Requiring PKD2. *Cell.* 2002;109(2):157–68.
 84. Li X, Luo Y, Starremans PG, McNamara CA, Pei Y, Zhou J. Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nat Cell Biol.* 2005;7(12):1202–12.
 85. Wu G, Mochizuki T, Le TC, Cai Y, Hayashi T, Reynolds DM, u. a. Molecular Cloning, cDNA Sequence Analysis, and Chromosomal Localization of Mouse Pkd2. *Genomics.* 1997;45(1):220–3.
 86. Wu G, Tian X, Nishimura S, Markowitz GS, D'Agati V, Park JH, u. a. Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2002;11(16):1845–54.
 87. Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, u. a. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet.* 2000;24(1):75–8.
 88. Murakami M, Ohba T, Xu F, Shida S, Satoh E, Ono K, u. a. Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5626–35.
 89. Nomura H, Turco AE, Pei Y, Kalaydjieva L, Schiavello T, Weremowicz S, u. a. Identification of PKDL, a Novel Polycystic Kidney Disease 2-Like Gene Whose Murine Homologue Is Deleted in Mice with Kidney and Retinal Defects. *J Biol*
 90. Fushimi K, Sasaki S, Yamamoto T, Hayashi M, Furukawa T, Uchida S, u. a. Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct. *Am J Physiol.* 1994;267(4 Pt 2):F573-582.

91. Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(24):11663–7.
92. Roth J, Brown D, Norman AW, Orci L. Localization of the vitamin D-dependent calcium-binding protein in mammalian kidney. *Am J Physiol*. 1982;243(3):F243-252.
93. Bachmann S, Metzger R, Bunnemann B. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry*. 1990;94(5):517–23.
94. Fasth A, Hoyer JR, Seiler MW. Renal tubular immune complex formation in mice immunized with Tamm-Horsfall protein. *Am J Pathol*. 1986;125(3):555–62.
95. McKenzie JK, McQueen EG. Immunofluorescent localization of Tamm-Horsfall mucoprotein in human kidney. *J Clin Pathol*. 1969;22(3):334–9.
96. Wulf E, Deboen A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(9):4498–502.
97. Andrews PM, Bates SB. Filamentous actin bundles in the kidney. *Anat Rec*. 1984;210(1):1–9.
98. Foidart JM, Bere EW, Yaar M, Rennard SI, Gullino M, Martin GR, u. a. Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab Invest*. 1980;42(3):336–42.
99. Circularity [Internet]. [zitiert 28. September 2016]. Verfügbar unter: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/circularity.html>
100. ImageJ User Guide - IJ 1.46r | Analyze Menu [Internet]. [zitiert 28. September 2016]. Verfügbar unter: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#toc-Subsection-30.1>
101. Thundukattil VV, Gangadharan A, John SS. Use of Ramanujan's equation of ellipse to determine arch perimeter. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2016;149(5):592–3.
102. Circumference/Perimeter of an Ellipse: Formula(s) - Numericana [Internet]. [zitiert 10. November 2016]. Verfügbar unter: <http://www.numericana.com/answer/ellipse.htm>
103. Ramanujan approximation for circumference of an ellipse [Internet]. [zitiert 10. November 2016]. Verfügbar unter: <http://www.johndcook.com/blog/2013/05/05/ramanujan-circumference-ellipse/>
104. Ausiello DA, Skorecki KL, Verkman AS, Bonventre JV. Vasopressin signaling in kidney cells. *Kidney Int*. 1987;31(2):521–9.
105. Burnatowska-Hledin MA, Spielman WS. Vasopressin increases cytosolic free calcium in LLC-PK1 cells through a V1-receptor. *Am J Physiol*. 1987;253(2 Pt 2):F328-332.
106. Dibas AI, Rezazadeh SM, Vassan R, Mia AJ, Yorio T. Mechanism of vasopressin-induced increase in intracellular Ca²⁺ in LLC-PK1 porcine kidney cells. *Am J Physiol*. 1997;272(3 Pt 1):C810-817.
107. Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1993;265(3):C577–606.

108. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):413–92.
109. Himpen B, De Smedt H, Casteels R. Intracellular Ca²⁺ signaling induced by vasopressin, ATP, and epidermal growth factor in epithelial LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 1993;265(4 Pt 1):C966-975.
110. Tang MJ, Weinberg JM. Vasopressin-induced increases of cytosolic calcium in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 1986;251(6 Pt 2):F1090-1095.
111. Akerboom J, Rivera JDV, Guilbe MMR, Malavé ECA, Hernandez HH, Tian L, u. a. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J Biol Chem.* 2009;284(10):6455–64.
112. Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 2001;19(2):137–41.
113. Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, u. a. Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature.* 2013;499(7458):295–300.
114. Wang Q, Shui B, Kotlikoff MI, Sonderrmann H. Structural basis for calcium sensing by GCaMP2. *Structure.* 2008;16(12):1817–27.
115. Akerboom J, Chen T-W, Wardill TJ, Tian L, Marvin JS, Mutlu S, u. a. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci.* 2012;32(40):13819–40.
116. Ding J, Luo AF, Hu L, Wang D, Shao F. Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. *Sci China Life Sci.* 2014;57(3):269–74.
117. Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasan SH, u. a. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods.* 2009;6(12):875–81.
118. Dreosti E, Odermatt B, Dorostkar MM, Lagnado L. A genetically encoded reporter of synaptic activity in vivo. *Nat Methods.* 2009;6(12):883–9.
119. Mao T, O'Connor DH, Scheuss V, Nakai J, Svoboda K. Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. *PLoS ONE.* 2008;3(3):e1796.
120. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, u. a. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 1997;388(6645):882–7.
121. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(22):11984–9.
122. Garcia-Parajo MF, Koopman M, van Dijk EMHP, Subramaniam V, van Hulst NF. The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14392–7.
123. Jakobs S, Subramaniam V, Schönle A, Jovin TM, Hell SW. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Letters.* 2000;479(3):131–5.

124. Todeschini A-L, Georges A, Veitia RA. Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Trends Genet.* 2014;30(6):211–9.
125. Ipsaro JJ, Joshua-Tor L. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(1):20–8.
126. Burnatowska-Hledin MA, Spielman WS. Vasopressin increases cytosolic free calcium in LLC-PK1 cells through a V1-receptor. *Am J Physiol.* 1987;253(2 Pt 2):F328-332.
127. Weinberg JM, Davis JA, Shayman JA, Knight PR. Alterations of cytosolic calcium in LLC-PK1 cells induced by vasopressin and exogenous purines. *Am J Physiol.* 1989;256(5 Pt 1):C967-976.
128. Kotlikoff MI. Genetically encoded Ca²⁺ indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology. *J Physiol (Lond).* 2007;578(Pt 1):55–67.
129. Baert L. Hereditary polycystic kidney disease (adult form): A microdissection study of two cases at an early stage of the disease. *Kidney International.* 1978;13(6):519–25.
130. D’Agati V, Trudel M. Lectin characterization of cystogenesis in the SBM transgenic model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 1992;3(4):975–83.
131. Grantham JJ. Polycystic kidney disease: a predominance of giant nephrons. *Am J Physiol.* 1983;244(1):F3-10.
132. Cuppage FE, Huseman RA, Chapman A, Grantham JJ. Ultrastructure and function of cysts from human adult polycystic kidneys. *Kidney International.* 1980;17(3):372–81.
133. Heggö O. A microdissection study of cystic disease of the kidneys in adults. *J Pathol.* 1966;91(2):311–5.
134. Verani RR, Silva FG. Histogenesis of the renal cysts in adult (autosomal dominant) polycystic kidney disease: a histochemical study. *Mod Pathol.* 1988;1(6):457–63.
135. Belibi FA, Reif G, Wallace DP, Yamaguchi T, Olsen L, Li H, u. a. Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int.* 2004;66(3):964–73.
136. Yamaguchi T, Pelling JC, Ramaswamy NT, Eppler JW, Wallace DP, Nagao S, u. a. cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Kidney Int.* 2000;57(4):1460–71.
137. Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson SJ, Grantham JJ, Calvet JP. Calcium Restriction Allows cAMP Activation of the B-Raf/ERK Pathway, Switching Cells to a cAMP-dependent Growth-stimulated Phenotype. *J Biol Chem.* 2004;279(39):40419–30.
138. Kip SN, Hunter LW, Ren Q, Harris PC, Somlo S, Torres VE, u. a. [Ca²⁺]_i reduction increases cellular proliferation and apoptosis in vascular smooth muscle cells: relevance to the ADPKD phenotype. *Circ Res.* 2005;96(8):873–80.
139. Qian Q, Hunter LW, Li M, Marin-Padilla M, Prakash YS, Somlo S, u. a. Pkd2 haploinsufficiency alters intracellular calcium regulation in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet.* 2003;12(15):1875–80.

140. Aperis G, Alivanis P. Tolvaptan: a new therapeutic agent. *Rev Recent Clin Trials*. 2011;6(2):177–88.
141. Gattone VH, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med*. 2003;9(10):1323–6.
142. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, u. a. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2012;367(25):2407–18.
143. Torres VE, Meijer E, Bae KT, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, u. a. Rationale and design of the TEMPO (Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcomes) 3-4 Study. *Am J Kidney Dis*. 2011;57(5):692–9.
144. Wang X, Gattone V, Harris PC, Torres VE. Effectiveness of Vasopressin V2 Receptor Antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on Polycystic Kidney Disease Development in the PCK Rat. *JASN*. 2005;16(4):846–51.
145. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol*. 2005;4(1):2.
146. Abdul-Majeed S, Nauli SM. Calcium-mediated mechanisms of cystic expansion. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(10):1281–90.
147. Saadi-Kheddouci S, Berrebi D, Romagnolo B, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Kahn A, u. a. Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene. *Oncogene*. 2001;20(42):5972–81.
148. Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Krönig C, u. a. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet*. 2005;37(5):537–43.
149. Kim I, Ding T, Fu Y, Li C, Cui L, Li A, u. a. Conditional Mutation of Pkd2 Causes Cystogenesis and Upregulates β -Catenin. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(12):2556–69.
150. Delling M, Indzhukulian AA, Liu X, Li Y, Xie T, Corey DP, u. a. Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. *Nature*. 2016;531(7596):656–60.
151. Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, Takeshima H, Iino M. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns. *Science*. 1999;284(5419):1527–30.
152. Lazarowski ER, Boucher RC. UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci*. 2001;16:1–5.
153. Liu W, Xu S, Woda C, Kim P, Weinbaum S, Satlin LM. Effect of flow and stretch on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(5):F998–1012.
154. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK Cell Primary Cilium Increases Intracellular Calcium. *J Membrane Biol*. 184(1):71–9.
155. Xu GM, González-Perrett S, Essafi M, Timpanaro GA, Montalbetti N, Arnaout MA, u. a. Polycystin-1 Activates and Stabilizes the Polycystin-2 Channel. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1457–62.

156. Will PD-I habil D, Gebhardt PD-I habil N, Nollau PD-I habil R, Herschel PD paed D, Ströhl PD-I habil H. Berechnungsgrundlagen. In: Will D, Gebhardt N, Herausgeber. *Hydraulik* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2011 [zitiert 7. Dezember 2016]. S. 41–106. Verfügbar unter:
http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-17243-4_4
157. Briggs JP, Schnermann J. The tubuloglomerular feedback mechanism: functional and biochemical aspects. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:251–73.
158. Kirchheim HR, Ehmke H, Hackenthal E, Löwe W, Persson P. Autoregulation of renal blood flow, glomerular filtration rate and renin release in conscious dogs. *Pflugers Arch.* 1987;410(4–5):441–9.
159. Vallon V. Tubuloglomerular Feedback and the Control of Glomerular Filtration Rate. *Physiology.* 2003;18(4):169–74.
160. Capasso G, Mollica F, Saviano C, De Santo NG. Tubule effects of glomerular hyperfiltration: an integrated view. *Semin Nephrol.* 1995;15(5):419–25.
161. Besschetnova TY, Kolpakova-Hart E, Guan Y, Zhou J, Olsen BR, Shah JV. Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Curr Biol.* 2010;20(2):182–7.
162. Delling M, DeCaen PG, Doerner JF, Febvay S, Clapham DE. Primary cilia are specialized calcium signalling organelles. *Nature.* 2013;504(7479):311–4.

**Mein Dank gilt allen Mitarbeitern
des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie,
die mich während meiner Arbeit unterstützt haben, insbesondere
Dr. Melanie Grosch, Marion Kubitza, Larissa Osten,
Uwe de Vries und Prof. Dr. Ralph Witzgall.**

